FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

N° 2

SUR LA CHROMATOGRAPHIE EN COUCHES MINCES DES AZOÏQUES PHÉNOLIQUES

THÈSE

présentée et publiquement soutenue
devant la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Marseille

LE FEVRIER 1968

par

DUONG CHAM CUONG

née le 29 Juin 1939 à Thanh-Hoa (Viet-Nam)

PHARMACIEN

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examinateurs de la Thèse	MM. les Professeurs	DUMAZERT	Président
		GREBUS	Assesseurs
		CRISTAU	
		GHIGLIONE	

IMPRIMERIE LINO-IMP — MARSEILLE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545823_0061

DUONG CHAM CUONG

SUR LA CHROMATOGRAPHIE EN COUCHES MINCES DES AZOÏQUES PHÉNOLIQUES

Faculté mixte de médecine et de pharmacie de Marseille

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Doyen : H. GASTAUT
Doyen honoraire : G. MORIN
Assesseurs : Ch. GREBUS et J. CHARPIN
Attaché Principal, Chef des Services Administratifs : P. MOUCHET.

PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. MONGES, ROCHE, CHAUVIN, MATTEI, DE VERNEJOUL, GIRAUD, MERCIER, MARONNEAUD, VIGNOLI.

PROFESSEURS TITULAIRES DE CHAIRES

Anatomie	MM. GRISOLI
Anatomie appliquée et Chirurgie expérimentale	HENRY
Anatomie pathologique	GASTAUT
Bactériologie et virologie	BRAHIC
Biochimie médicale	LISSITZKY
Botanique et Cryptogamie	PELLISSIER
Cardiologie Clinique et Expérimentale	JOUVE
Chimie	DUMAZERT
Chimie analytique et hydrologie	PASTOR
Chimie biologique	DERRIEN
Chimie minérale	MOURGUE
Clinique Chirurgicale	CARCASSONNE
Clinique Chirurgicale	LAMY
Clinique Chirurgicale	LENA
Clinique Chirurgicale Infantile et orthopédie	SALMON
Clinique de Chirurgie Thoracique	DOR
Clinique Dermatologique	HADIDA
Clinique d'Endocrinologie	VAGUE
Clinique Exotique	BLANC
Clinique Médicale	N...
Clinique Médicale	AUDIER
Clinique Médicale Thérapeutique et des Maladies du Sang	OLMER
Clinique des Maladies infectieuses	RAYBAUD
Clinique des Maladies des voies disgestives et de la nutrition	MONGES H
Clinique Médicale infantile	BERNARD R.
Clinique de Neurologie	BOUDOURESQUES
Clinique Neuro-Chirurgicale	PAILLAS
Clinique Obstétricale et Gynécologie	SERMENT
Clinique Ophtalmologique	JAYLE
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique	APPAIX
Clinique Pneumo-Phtisiologique	CHARPIN
Clinique psychiatrique	SUTTER
Clinique Rhumatologique	RECORDIER
Clinique Stomatologique	LACHARD
Clinique Urologique	DUCASSOU

Electroradiologie	MM.	LEGRE
Histologie et Embryologie		PICARD
Histologie et Embryologie		STAHL
Hygiène et Médecine sociale		SAUTET
Médecine expérimentale		DONNET
Médecine légale et Médecine du travail		MOSINGER
Parasitologie		RANQUE
Pathologie Chirurgicale		GRANJON
Pathologie Interne		MOUREN
Pharmacie Chimique		CRISTAU
Pharmacie Galénique et Matière Médicale		BERNARD P.
Pharmacologie Pharmaceutique		MERCIER J.
Physiologie		MORIN
Physiopathologie des voies respiratoires		LAVAL
Physique		DUBOULOZ
Physique Médicale		ROUX
Thérapeutique		N...
Zoologie et Microbiologie		GREBUS
Toxicologie		VIALA

PROFESSEURS TITULAIRES A TITRE PERSONNEL

MM.	BOUGEON René	Chirurgie
	FARNARIER	Ophtalmologie
	HOUEL	Chirurgie thoracique et Chirurgie du cœur
	IMBERT	Chirurgie Générale
	LAFFARGUE	Anatomie Pathologique
	ORSINI	Pédiâtrie
	PAYAN	Anatomie Pathologique
	SERAFINO	Chirurgie
	TAMALET	Microbiologie
	TISSIE	Oto-Rhino-Laryngologie

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.	MM.	MM.
DESPIEDS	CORRIOL	JULLIEN
DESANTI	BARET	DALMAS
GEVAUDAN		

MAITRES DE CONFERENCES — AGREGES

MM.	MM.	MM.
ACHARD	CHEVROT	GASCARD
ARDISSON	CODACCIONI	GAYTE-SORBIER
ARNOUX A.	COMBALBERT	GERARD
BARET	COURBIER	GIRAUD F.
BATTESTI	CREVAT	GHIGLIONE
BERNARD P.M.	DELMONT	GRIMAUD
BOUYALA	DOR	GUERINEL
BIMAR	DUMON	HUGUET
BUISSON	FRANÇOIS	IMBERT Paul
BUREAU	FOURNIER	Mme JOUVE
CARCASSONNE M.	GARCIN	KAPHAN
CLAUSTRE	GAUTHIER	LANZA Maurice

UNIV. LEIDEN BIB

MM.	MM.	MM
LOUCHET	RICHAUD	SOULAYROL
MONGIN	RICHELME	SPITALIER
MONTIES	ROLLAND	TARANGER
MURATORE	SALAMON	TATOSSIAN
NICOLI	SARACCO	TOGA
PLASSE	SARLES	VITRY
RAYBAUD C.	SEDAN	ZWIRN
REYNAUD	SEITE	

AGREGES EN EXERCICE

MM.	MM.	MM.
BERARD	COMITI	RUF
BREMOND	GARES	SIMONIN
BRICOT	JEAN	TEMINE
CARCASSONNE Y	MICHOTEY	TRIFAUD
CASANOVA	MONGES André	
COIGNET	REBOUD	

AGREGES LIBRES

MM.	MM.	MM.
BERTHIER	DEVIN	OLLIVIER
BOURRET	FIGARELLA	OURGAUD
CHAUVIN	GAMBARELLI	PAOLI

A Monsieur le Professeur C. DUMAZERT

Professeur de Chimie à la Faculté Mixte

de Médecine et de Pharmacie de Marseille

qui nous a fait le très grand honneur
d'accepter la présidence de notre thèse.

Hommage de notre profond respect

A Monsieur le Professeur Agrégé C. GHIGLIONE

de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie

de Marseille

qui nous a inspiré le sujet de cette thèse et nous a constamment guidé de ses précieux conseils et de sa vaste science.

Hommage de notre profonde gratitude

A TOUS NOS MAITRES

de la Faculté de Pharmacie

de Saïgon

qui nous ont donné les bases de notre formation professionnelle.

Hommage de notre profonde gratitude

A Monsieur le Professeur TRUONG VAN CHOM

Ancien Recteur de l'Université de Hué

Ancien Doyen de la Faculté de Médecine de Saïgon

Cher Maître,

Vous m'avez appris plus que la science, la méthode du travail et l'amour de la recherche. J'admire en vous vos qualités humaines exceptionnelles qui vous ont permis de rester digne à travers toutes les épreuves.

Veuillez trouver ici le faible témoignage de ma reconnaissance infinie et de mon fidèle attachement.

A MES PARENTS

A MES FRERES ET SŒURS, les CHAM et les THUY

A KHOA KIEM et A NOTRE FILLE DIEU CHAM

Tout mon amour

AVANT-PROPOS

Les phénols sont très répandus dans la nature et un certain nombre sont très utilisés comme médicaments.

L'identification et le dosage des différents phénols entrant dans la composition d'un mélange présentent des difficultés, surtout lorsque l'on se trouve en présence d'isomères ou de composés de structures voisines, lorsqu'on ne dispose que de faibles quantités de matière et enfin lorsque les quantités relatives des constituants sont très différentes.

Les réactions mises en œuvre ne sont pas spécifiques. Il est indispensable de faire précéder les dosages de séparations qui sont basées, à l'heure actuelle, essentiellement sur les méthodes chromatographiques.

Avant d'aborder la relation de nos recherches nous nous sommes attachée, dans une première partie de notre thèse, à rassembler dans un exposé bibliographique, les principales techniques de caractérisation, de dosage et de séparation des phénols simples décrites dans la littérature.

INTRODUCTION

I. — *PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DES PHENOLS*

Les phénols sont des corps bien cristallisés, peu solubles dans l'eau, solubles dans les lessives alcalines, très solubles dans l'éther éthylique qui parvient même à les extraire de leurs solutions aqueuses alcalines. Les monophénols de faible poids moléculaire possèdent des tensions de vapeur élevées et sont entraînables par les vapeurs.

Ils absorbent la lumière ultraviolette. Les valeurs de la longueur d'onde maxima d'absorption (ξ_m) et de l'absorption moléculaire (λ_m) dépendent du solvant dans lequel on les dissout (alcools, solution aqueuse acide ou alcaline...).

Le tableau n° 1 renferme différentes constantes physiques (poids moléculaire (P.M.), température d'ébullition à la pression ordinaire (E. 760) et spectrophotométriques (λ_m et ξ_m) des phénols simples les plus courants.

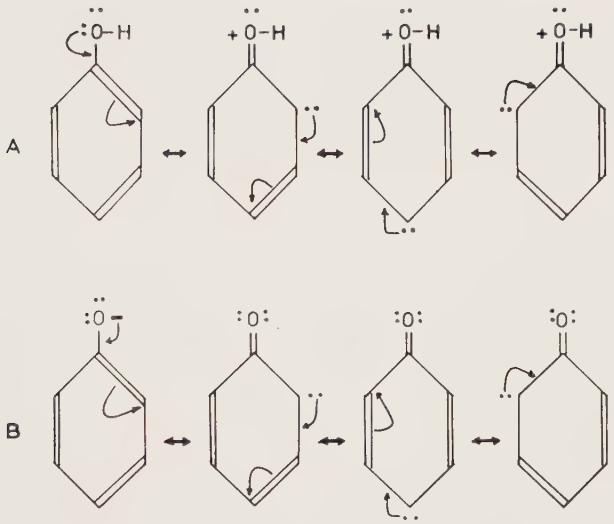
TABLEAU 1

Constantes physiques et spectrophotométriques de quelques phénols simples (24)

Nom	P.M.	E_{760}	Données spectrophotométriques		
			solvant	λ_m	ξ_m
Phénol	94,11	182	éthanol	275	2090
			eau	269	1410
o-crésol	108,13	191,5	éthanol	275	2090
			eau	270	1886
m-crésol	108,13	202,8	éthanol	276	2180
			eau	271	1544
p-crésol	108,13	202,5	éthanol	279	2006
			eau	275	1669
2,4 xylénol	122,16	211,5	éthanol	278	1892
			eau	276	1685
thymol	150,21	233,5	éthanol	276	2118
			eau	273	1740
carvacrol	150,21	237,9	éthanol	275	1787
			eau	272	1502
gaïacol	124,13	205	éthanol	274	2572
			eau	273	2083
eugénol	164,2	252	éthanol	282	2000
			eau	280	2000
iso-eugénol	164,2	267,5	éthanol	261	20000
			eau	254	14000

Les propriétés chimiques des phénols sont la conséquence de leur importante mésomérie due au caractère donneur d'électrons de l'hydrogène hydroxylique (A). Ceci confère une mobilité particulière à l'hydrogène fonctionnel (acide faible) ainsi qu'aux hydrogènes nucléaires situés en *ortho* et en *para* par rapport à la fonction phénolique.

Les phénates alcalins (B), fortement dissociés en milieu aqueux, portent une charge négative sur l'atome d'oxygène et, de ce fait, possèdent un caractère nucléophile plus accusé que les phénols.



Les phénols sont sensibles aux oxydants qui les transforment en quinones, lesquelles sont particulièrement réactives.

Les réactions mises à profit dans la Chimie Analytique des phénols sont donc :

— des réactions de substitution de l'hydrogène phénolique (éthérification, estérification).

— des réactions de substitution électrophile sur le noyau aromatique (halogénation, diazocopulation...).

— des réactions d'oxydation.

— des réactions d'addition moléculaire et de formation de complexes avec les métaux.

II. — *METHODES GENERALES D'ANALYSE DES PHENOLS*

A) *Ethérification.*

Les phénates alcalins se condensent avec les réactifs possédant un halogène suffisamment mobile pour conduire à des éthers. Les réactifs les plus couramment utilisés sont :

— le bromure de p. nitrobenzène (55, 46).

— le bromure de 2,4 dinitrobenzène (5).

— l'acide monochloracétique.

Les éthers obtenus à partir des phénols substitués (halogénés et nitrés) sont bien cristallisés mais ne présentent pas toujours des points de fusion distincts. L'isolement de ces corps permet néanmoins d'établir la masse moléculaire du composé isolé.

Le sulfate de méthyle et le sulfate d'éthyle agissent en milieu alcalin pour fournir les éthers méthyliques et éthyliques. Ces

éthers, de points d'ébullition plus bas que ceux des phénols correspondants et moins sensibles à l'action des oxydants, sont facilement séparés en chromatographie en phase gazeuse. Il en est de même des éthers triméthylsilyliques obtenus par action de l'hexaméthylsilane sur les phénols en présence de catalyseurs minéraux oxygénés et acides (silice) (23).

B) *Estérification.*

On sait que les esters phénoliques ne peuvent pratiquement s'obtenir que par action des chlorures et des anhydrides d'acide sur les phénols. On opère soit en milieu aqueux et fortement alcalin, soit en présence d'un catalyseur alcalin en milieu anhydre. En effet, l'estérification par les acides libres est désespérément lente : elle échappe à la catalyse par les acides du fait de l'attraction des doublets libres de l'atome d'oxygène par le noyau aromatique qui les rend indisponibles.

Les principaux esters phénoliques utilisés en chimie analytique sont ceux des acides suivants :

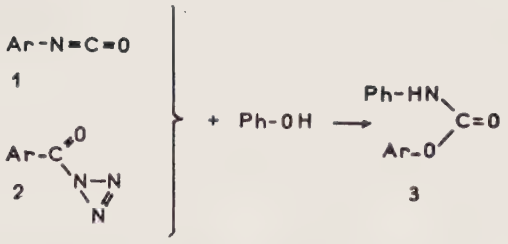
— acide acétique (11)
— acide benzoïque
— acide p. nitrobenzoïque
— acide 3,5 dinitrobenzoïque (52)
— acide p.nitrophénylacétique (76)
— acide benzène sulfonique
— acide p. toluène sulfonique
— acide p. bromobenzène sulfonique (65)
— acide α-phénylcinnamique.

Les esters des acides aromatiques, et en particulier ceux des acides p. toluène sulfonique et p. bromobenzène sulfonique, ont des points de fusion assez élevés et suffisamment caractéristiques pour permettre l'identification des crésols, des bromophénols et nitrophénols isomères.

Les esters acétiques ont des points de fusion peu élevés. On les obtient en faisant réagir à chaud une quantité connue d'anhydride acétique sur le phénol au sein de la pyridine anhydre. Puis l'anhydride en excès est hydrolysé et on dose l'acide formé au moyen d'une solution titrée de soude. Il est facile alors de calculer la quantité d'anhydride ayant réagi avec le poids de la prise d'essai de phénol mis en jeu.

Les urethanes et les allophanates, qui sont respectivement les esters de l'acide carbamique ($H_2N—COOH$) et de l'acide allophanique ($H_2N—CO—NH—COOH$) permettent également d'identifier les phénols.

Les uréthanes (3) sont obtenus par action des isocyanates (1) ou des azides (2) sur les phénols.



Les allophanates sont préparés par action d'un excès d'acide isocyanique sur le phénol. Dans un premier temps l'uréthane non substitué à l'azote se forme ; il réagit ensuite sur l'acide isocyanique en excès pour condduire à l'ester désiré selon le système d'équations suivant :

$$Ph—OH + O=C=NH \longrightarrow H_2N—CO—O—Ph$$
$$Ph—O—CO—NH_2 + O=C=NH \longrightarrow H_2N—CO—NH—CO—O—Ph$$

Les uréthanes issus du p. bromobenzazide présentent des points de fusion caractéristiques. C'est ainsi que l'on peut caractériser les uréthanes des o-, m- et p-crésols (Pt. F = 162°, 126° et 212°) (58). Les allophanates ont été utilisés avec succès dans plusieurs cas et notamment pour isoler le tocophénol (19).

C) *Réactions de substitution électrophile des hydrogènes nucléaires.*

1) *Halogénation.* — Le brome est l'halogène le plus commodément utilisé pour effectuer de telles réactions de substitution. La bromométrie est la méthode la plus typique de dosage des phénols. On utilise dans ce but une solution titrée contenant du bromure et du bromate de potassium. Le brome naissant libéré en milieu acide se substitue aux hydrogènes nucléaires mobiles. Une molécule d'halogène est nécessaire pour chaque atome d'hydrogène substituable (trois au maximum si les deux positions *ortho* et la position *para* sont libres). L'excès de brome libère l'iode d'une solution d'iodure de potassium et l'iode formé est dosé au moyen d'une solution titrée d'hyposulfite de sodium.

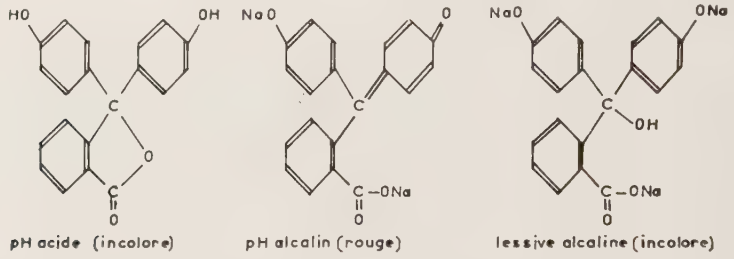
Les dérivés bromés sont insolubles en milieu aqueux. Ils sont facilement isolés et présentent des points de fusion assez caractéristiques. En mélange on peut les séparer par chromatographie (voir p. 33).

2) *Formation des phtaléines.* — Les phtaléines, colorants découverts en 1871 par Bayer, résultent de la condensation des phénols avec l'anhydride phtalique. La condensation s'effectue le plus généralement en milieu acide sulfurique mais aussi en présence de certains chlorures métalliques (chlorure de zinc et chlorure d'aluminium).

Selon le pH de leur solution, les phtaléines présentent des colorations variables. Les phtaléines dérivées du 1-3 dihydroxy

benzène (résorcine), présentent une forte fluorescence (fluorescéine). Il faut noter qu'un excès d'alcali provoque la décoloration de la solution par formation de sel tri-sodé.

Les différentes structures de la phtaléine la plus simple : la phénolphtaléine, en fonction du pH sont les suivantes :

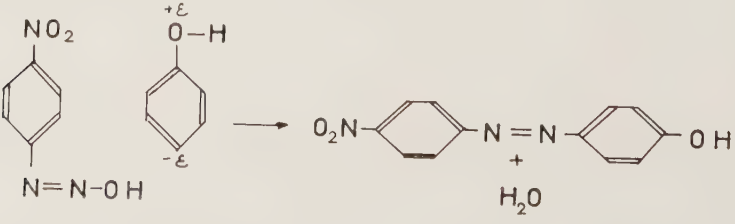


Les colorations des solutions ammoniacales des principales phtaléines sont rassemblées ci-dessous :

phénol	coloration de la solution ammoniacale de la phtaléine
phénol	rouge
gaiacol	violet
thymol	rouge
naphtol	vert
naphtol	jaune

3) *Diazocopulation.* — La formation d'hydroxyazoïque par copulation d'un diazoïque et d'un phénol est une réaction particulièrement intéressante. Elle s'opère de préférence en *para* lorsque cette position est libre ; sinon elle s'effectue en *ortho.*

La diazocopulation présente les caractères essentiels d'une substitution électrophile du cation diazonium sur les sommets négatifs du noyau phénolique.



Cette conception du mécanisme réactionnel est étayée par le fait que la réaction est facilitée par toutes les influences structu-

rales qui augmentent le caractère nucléophile du phénol et le caractère électrophile du diazoïque.

La copulation est en général effectuée en milieu basique car alors l'ion phénate est un agent nucléophile plus actif que le phénol. De même la présence d'un substituant accepteur d'électrons en *para* sur le diazoïque qui augmente le caractère électrophile de l'ion diazonium accélère la réaction. C'est ainsi que les résultats suivants, portant sur la vitesse relative de copulation du phénol avec des diazoïques diversement parasubstitués, illustrent l'influence de ces substituants :

Substituant en para sur le diazoïque	$-NO_2$	$-SO_3H$	$-Br$	$-H$	$-CH_3$	$-OCH_3$
Vitesse relative de condensation	1300	13	13	1	0,4	0,01

La préparation du sel de diazonium exige une attention particulière. On sait que la diazotation consiste à faire réagir sur un sel d'une amine aromatique primaire juxta-nucléaire l'acide nitreux naissant obtenu extemporanément par addition de nitrite de sodium à la liqueur acide. La vitesse de la diazotation dépend :

— de la concentration en acide nitreux non dissocié

— de la nature et de la concentration en amine

— de la nature et de la concentration en acide minéral.

La réaction de diazotation est d'autant plus rapide que l'amine est plus basique ; dans les conditions normales elle est toujours achevée en une demi-heure. Il est nécessaire que la concentration en acide minéral soit suffisante pour assurer une bonne dissolution de l'amine, pour éviter la dissociation de l'acide nitreux et, enfin, pour empêcher la formation de l'azoïque entre le diazoïque formé et l'amine qui n'a pas encore réagi.

La stabilité des solutions de diazoïque est relativement faible. Les diazoïques se décomposent à une température supérieure à + 5° pour donner du phénol et libérer de l'azote moléculaire. Ils sont sensibles à la lumière.

Un certain nombre de sels de diazonium, désignés sous le vocable de « sels de Bentramine (*) » sont commercialisés sous forme stable. Lugg (45) a décrit une méthode de styli-réaction d'identification et une méthode de dosage des phénols en se servant de ces réactifs. Ceci évite l'étape délicate de la diazotation de l'amine. Parmi les 25 composés étudiés, Lugg retient 11 bentramines. Nous avons rassemblé, dans le tableau n° 2, les dénominations commerciales et les pH optimum permettant la copulation.

(*) Les sels de Bentramine sont commercialisés par "Imperial Chemical Industries of Australia and New-Zeland Ltd" (I.C.I.A.N.Z.) et inscrits au "Colour Index of the Society of Dyes and Colorits" en association avec "The American Association of Textils, Chemits and Colorits" 2nd Ed. 1956.

TABLEAU II

Dénominations commerciales des sels stables de diazonium (Bentramine) et pH optimums de copulation

dénomination	amine correspondante	copulation pH de
Fast orange GC	m.chloraniline (HCl)	7
Fast Scarlet GG	2.5-dichloraniline	7
Fast Red B	4.nitroanisidine	7
Fast Orange GR	0-nitraniline	9
Fast Red GL	4.amino.3.nitrotoluène	4
Fast Scarlet R	2.amino.4.nitroanisole	4
Fast blue 2B	4'.amino.2'5'.diethoxy-benzanilide	9
Fast Red RL	2.amino.3.nitrotoluène	9
Fast Red CG	p. nitraniline	9 et 12,8
Fast Blue B	O. dianisidine	9

Lorsque le phénol présente plusieurs hydrogènes substituables (*ortho* et *para*), on peut obtenir selon les conditions de pH le mono-azoïque ou des composés polysubstitués. En milieu acide faible, la substitution conduit au composé mono-azoïque. La substitution se fait principalement en *para* bien qu'une faible proportion de dérivé *ortho* soit obtenue (de 0,5 à 1 p. 100). En milieu alcalin on obtient les composés polysubstitués. C'est ainsi que dans ces conditions Grandmougin et Freimann (3) ont pu isoler à côté du phénol 2.4.bis-azobenzène, le phénol 2.4.6. triazobenzène, en traitant le phénol par le chlorure de diazonium dérivé de l'aniline.

« Il est donc important de retenir que pour obtenir systéma-« tiquement un seul dérivé choisi de substitution, il est indispen-« sable de fixer le pH du milieu réactionnel en tamponnant à « l'aide de diverses solutions salines (acétate, carbonate, borate...)».

La température influence la vitesse de la réaction de copulation et l'orientation de la substitution. On opère en général à la température du laboratoire pour les diazocopulations en milieu acide et à une température inférieure à 15° pour celles effectuées en milieu alcalin. Certaines réactions nécessitent des températures plus élevées pouvant atteindre 75°.

Le p. nitrobenzène diazonium est le réactif le plus couramment utilisé en raison de sa stabilité et de sa grande vitesse de réaction avec les phénols. Les monohydroxyazoïques des phénols sont facilement isolés et sont solubles dans divers solvants. En milieu alcalin, les solutions présentent des colorations différentes selon la nature du solvant et l'azoïque.

Nous avons rassemblé, dans le tableau n° 3, les colorations et les longueurs d'onde maxima d'absorption des solutions d'azoïques des phénols courants dans divers solvants (49).

TABLEAU III

Colorations et longueurs d'onde maxima d'absorption de diverses solutions alcalines des hydroxyazoïques dérivés du p. nitrobenzène diazonium et des phénols courants

Phénols	SOLVANTS ALCALINISES					
	Acétone coloration	λ_m	Alcool coloration	λ_m	Eau coloration	λ_m
phénol	pourpre	5675	rouge	5050	jaune brun	4750
m-crésol	bleu	5850	pourpre	5450	rouge-brun	4900
p-crésol	bleu	5900	pourpre	5400	orange	5000
gaïacol	bleu	6000	pourpre	5400	rouge	5100
thymol	bleu	6100	pourpre	5600	rouge	5150
engénol	bleu	6100	pourpre	5550	rouge	5300

Le p-nitrobenzène diazonium a reçu un très grand nombre d'applications analytiques. Moir (48) l'a utilisé dès 1922 comme test de caractérisation des phénols. Des améliorations à la méthode originale furent apportées par Theiss et Bénédict (73) et par de nombreux auteurs (1, 16, 61) pour effectuer le dosage des phénols dans les milieux biologiques.

La copulation se fait en milieu acide faible (pH = 5) tamponné par une solution d'acétate de sodium. La liqueur, alcalinisée après un temps convenable par le carbonate de soude, prend une coloration rouge intense. Au bout d'un certain temps on observe la formation d'un léger précipité. Afin d'obtenir un milieu optiquement stable, pour effectuer les déterminations photométriques, diverses solutions ont été proposées. Parmi celles-ci la plus ancienne consiste à ajouter, au milieu, une solution de gomme arabique ; la plus élégante décrite par Cazal (9) utilise le pouvoir clarifiant de l'acétone.

Récemment Smith et King (67) décrivent une méthode permettant d'opérer sur des quantités extrêmement réduites de phénols présents dans les fumées de cigarettes. La copulation s'obtient en milieu alcalin (pH = 9,8) en présence d'un tampon borate. L'absorption de la coloration des liqueurs s'effectue pour des longueurs d'onde comprises entre 490 et 505 mμ, longueurs d'onde qui se trouvent être différentes de celles correspondant à l'ab-

sorption maximale des solutions de monoazoïques (475 mμ en solution aqueuse, 567 mμ en solution acétonique).

Le diazoïque de l'*acide p. sulfanilique* est l'agent de la classique réaction de Pauly. La diazotation se réalise en milieu acide faible et le développement de la coloration en présence de carbonate de sodium. La liqueur colorée obtenue est ici parfaitement limpide.

En ce qui concerne le dosage de la tyrosine, Ghiglione et Bozzi-Tichadou (25) proposent le diazoïque de la 2.4.6 tribromaniline.

D) *Oxydation des phénols.*

Les phénols qui possèdent la position *para* libre s'oxydent en p. quinones ; ceux qui ont la position *para* substituée mais qui ont une position *ortho* libre sont transformés en o. quinones. Par contre, si les trois positions sont occupées, le phénol ne peut être oxydé.

Les méthodes colorimétriques de diagnose des phénols basées sur leur caractère réducteur sont nombreuses. On peut les classer en deux groupes principaux selon que :

— le phénol réduit un réactif dont la coloration est différente à l'état réduit et à l'état oxydé ;

— l'oxydation du phénol conduit à une quinone qui réagit sur un réactif pour former un composé coloré.

1) *Réduction des composés minéraux.* — Parmi les très nombreuses méthodes décrites, nous ne retiendrons que la réduction des molybdates, des phosphomolybdates et des acides tungstomolybdiques.

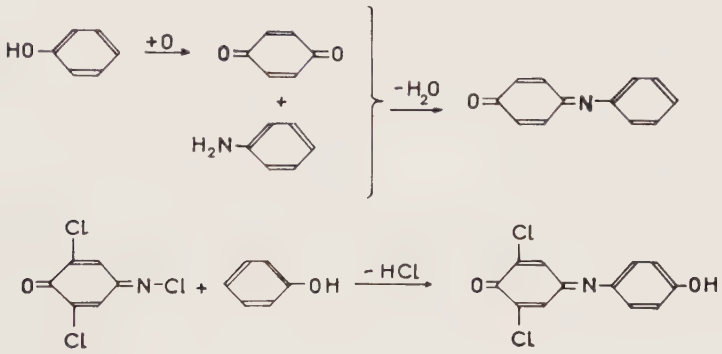
Les phénols provoquent la réduction du réactif de Frohde (54) : acide molybdique en milieu sulfurique. Ils réagissent également sur le réactif de Wavelet : réactif phosphomolybdique. La réaction a lieu en milieu ammoniacal selon les indications de Sanchez (59) ; Cristau (15) a étudié cette réaction en vue de la diagnose et du dosage de nombreux phénols.

Le réactif de Folin et Ciocalteu (20) a reçu, et de loin, le plus grand nombre d'applications analytiques. Décrit en 1927, sa partie active est constituée d'un mélange d'acides phosphotungstomolybdiques jaunes en milieu acide. Les phénols le réduisent en milieu alcalin (carbonate de sodium) pour fournir une coloration bleue due à un mélange indéterminé de sous-oxydes métalliques.

2) *Oxydation des phénols en présence d'aryl-amines.* — L'oxydation d'un phénol en présence d'une amine aromatique primaire juxta-nucléaire conduit à un indo-phénol ou N-arylquinone-imine. Ces composés sont généralement bleus en milieu acide dilué et rouges en milieu alcalin. C'est ainsi que l'*hypochlorite de sodium* agit sur une solution contenant du phénol et de

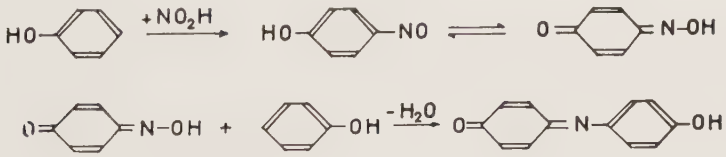
l'aniline pour fournir la N-phénylquinone-imine. De même la p.diméthylaminoaniline, préparée au sein du milieu par réduction de la p.nitrosodiméthylaniline, se condense en milieu oxydant avec les phénols. La réaction est rapide et d'une grande sensibilité (33).

Il faut rapprocher de ces réactions la formation des indophénols résultant de la condensation des phénols avec les quinones chlorimines.



Cette réaction qui préconise la 2.6.dichloro ou 2.6.dibromo quinone chlorimine a été retenue par Gibbs (26, 27). Le dérivé dichloré permet d'obtenir des indophénols de colorations différentes avec un assez grand nombre de phénols

En milieu acide dilué, les *nitrites* agissent sur les phénols pour donner des dérivés p.nitrosés. Ce sont les formes tautomères des monoximes de p.quinones. En milieu acide sulfurique concentré, la réaction évolue. La monoxime, obtenue tout d'abord, se condense dans un deuxième temps avec l'excès de phénol pour donner un indophénol. On obtient ainsi des colorations allant du bleu au pourpre selon le phénol mis en œuvre. Ces solutions virent au rouge par dilution aqueuse.



3) *Réaction de Millon.* — Cette réaction classique pour le dosage de la tyrosine consiste à traiter une solution de phénol par le réactif de Millon (47) préparé par la dissolution de mercure dans l'acide nitrique. De nombreuses variantes du réactif original ont été proposées. Tous les réactifs comportent la présence d'acide nitreux. On a essayé d'interpréter la formation de dérivés colorés en admettant une nitrosation préliminaire du phénol.

E) *Formation des composés d'addition :*

1) *avec les composés polynitrés.* — Par analogie avec les carbures aromatiques, les phénols donnent des composés d'addition moléculaire avec les dérivés polynitrés (acide picrique (2), 1.3.5. trinitrobenzène) sans intervention du groupement fonctionnel. Ces composés présentent des points de fusion permettant leur identification.

2) *avec le perchlorure de fer.* — L'addition d'une solution de sel ferrique à des solutions diluées de phénols, colore celles-ci en bleu, vert ou rouge selon le phénol. L'influence du milieu réactionnel est très importante sur le développement de la coloration. On peut opérer en effet soit en milieu aqueux, soit en milieu chloroformique en présence de pyridine.

Les substituants en *ortho* et *para* qui favorisent l'oxydation du phénol par le réactif ferrique diminuent généralement la sensibilité de la réaction. La présence en *méta* de sels substituants est au contraire favorable. Le groupe carboxyle en ortho stabilise la formation du complexe (acide salicylique et dérivés). En 1964, Gore et Newman (29) ont étudié quantitativement cette réaction. Ils ont montré que les phénols donnent des chélates à 5 ou 6 atomes dans leurs structures pseudo-cycliques. L'étude du comportement électrophorétique de ces composés permet de les distinguer. Le dosage photométrique des phénols sous forme de leurs complexes est alors possible.

III. — *SEPARATION DES PHENOLS ET DE LEURS DERIVES*

Les méthodes de micro-séparation utilisées, à l'heure actuelle, sont des techniques chromatographiques qui conduisent à opérer soit en colonne, soit sur des supports tels que le papier ou des couches minces de substances minérales ou organiques. La séparation se fait donc ou bien en phase liquide, ou en phase gazeuse.

Les phénols de faible poids moléculaire ont des tensions de vapeur élevées. Ceci présente un avantage certain lorsqu'on réalise la séparation en phase gazeuse ou en phase vapeur, c'est au contraire un inconvénient lors des chromatographies sur support car on enregistre alors des pertes en phénols lors de l'élimination des solvants de migration. Les propriétés physico-chimiques des phénols simples sont très voisines (solubilité, température d'ébullition). Aussi a-t-on souvent avantage à opérer sur leurs dérivés afin d'augmenter les différences existant entre les caractères qui servent à les séparer les uns des autres.

A) *Séparation par distribution à contre-courant.*

Le dispositif expérimental et l'application du principe de séparation par distribution à contre-courant résultent des travaux de Craig (14). En raison des propriétés acides des phénols, les systèmes utilisés comprennent un hydrocarbure (le plus généralement le cyclohexane) et un tampon alcalin (tampons phosphate 0,5 M de pH allant de 11,08 à 12,54). La séparation partielle du m- et p-crésol, des 2.4- et du 2.6-xylénol, ainsi que des 0-, m- et p-éthylphénol, est réalisable dans un appareillage présentant 53 unités de transfert (28). En couplant la technique de Craig avec des méthodes d'analyse physique des fractions (U.V. et I.R.) il est possible de montrer l'existence de 84 composés phénoliques dans les goudrons de houille de bas point d'ébullition et d'en identifier plus de la moitié (39).

B) *Chromatographie sur colonne.*

1) *Chromatographie liquide - gaz.* — En ce qui concerne la séparation des phénols libres, citons les travaux d'Irvine et Mitchell (36), de Karr, Brown, Estep et Hyphrey (38), de Janak et Komers (37) et ceux de Kreyembuhl et Weiss (41). Ces derniers travaillant sur une colonne de 11 m de long, de 7 mm de diamètre et utilisent comme phase stationnaire une graisse de silicone. Les résultats obtenus ne sont pas parfaits car il n'est pas possible d'isoler tous les individus de mélanges complexes comprenant des isomères

La séparation des éthers méthyliques a été étudiée par Bergmann et Jentszch (3). Carruthers, Johnstone et Plimmer (8) sur colonnes classiques. Plus récemment, Smith et King (66) opèrent sur colonne capillaire imprégnée de 2.xylylphosphate. Ces auteurs séparent ainsi le phénol, l'o-crésol, le bloc m- et p-crésol, l'o- le m- et le p-éthylphénol ainsi que tous les xylénols isomères. La température du travail est de 140° et l'azote sert de gaz vecteur. La séparation du m-crésol et du p-crésol est effectuée lorsque ces phénols sont sous forme de leurs esters acétiques.

Langer, Pantages et Wender (42), ainsi que Freedman et Charlier (22) ont séparé les éthers triméthylsilyliques des phénols sur colonne capillaire de 300 pieds avec le 2-4 xylylphosphate comme phase stationnaire. Ils opèrent à 125° avec l'hélium comme gaz vecteur. Les séparations sont très satisfaisantes.

2) *Chromatographie liquide - vapeur.* — Le principe de cette méthode a été proposé, en 1959, par Dumazert et Ghiglione (17). Elle présente la particularité d'utiliser comme phase mobile la vapeur d'eau ou d'éthanol. Les températures de travail sont inférieures à celles de la chromatographie liquide - gaz. Les vapeurs sont facilement condensées à la sortie de la colonne. L'analyse de l'effluent recueilli et fractionné sous forme liquide, s'en trouve facilitée par la mise en œuvre des méthodes analytiques classiques.

L'analyse et l'identification des composés séparés sont réalisées sur différents prélèvements des fractions de l'éluat à l'aide de plusieurs techniques analytiques. La chromatographie en phase vapeur est donc à la fois une méthode analytique et une technique micro-préparative.

Diverses phases stationnaires (graisse de silicone, glycérol, cholestérol) ont été étudiées dans le but de séparer les phénols simples (24). Ces phases ont des pouvoirs de résolution différents et l'ordre de sortie des phénols dépend des polarités relatives des phases fixes et des composés à séparer. Ceci permet donc de choisir la phase stationnaire la plus convenable à la résolution du mélange de constituants à séparer.

3) *Chromatographie solide - liquide.*

a) - *chromatographie d'adsorption :*

La chromatographie d'adsorption sur alumine a été assez peu développée dans le cas de la séparation des phénols (7, 44, 62, 74). La chromatographie des mélanges d'hydroxyazoïques a été réalisée sur colonne d'alumine par Stoltemberg (70). Il a été possible de séparer et de doser l'o-crésol contenu dans un mélange de crésols, de phénol et de xylénols.

b) - *chromatographie de partage :*

La chromatographie des phénols libres a été décrite par divers auteurs. Zhaner et Swann (79), Franc et Jokl (21), Sweeney et Bultman (72) opèrent sur silice hydratée, alors que White et Grant (77) utilisent la celite. La phase mobile adoptée par tous ces auteurs est le cyclohexane.

C) *Chromatographie sur support.*

1) *Chromatographie sur papier :*

a) - *chromatographie des phénols libres :*

Deux mises au point importantes ont été publiées sur ce sujet par Reio (56, 57) en 1959 et 1961. Cet auteur étudie le comportement d'environ 200 composés phénoliques par chromatographie sur papier Whatmann n° 1 à l'aide de 6 solvants différents.

A l'aide des phases mobiles proposées par cet auteur ainsi qu'avec celles décrites par Hudecek (35) et Schleede (60) on arrive assez aisément à séparer les monophénols et les diphénols. Cependant la séparation des isomères n'est pas particulièrement satisfaisante.

Clark (12) utilise, comme support, du papier imprégné d'une résine échangeuse d'ions base forte. Il a pu chromatographier ainsi et séparer 21 monophénols, 15 di- et tri-phénols et 17 acides aromatiques mono- et di-phénoliques.

b) - *chromatographie des dérivés des phénols :*

1) *Chromatographie des hydroxyazoïques.* — Hossfeld (34) a proposé, en 1951, la chromatographie des azoïques dérivés de l'acide p-sulfanilique. Les sels de sodium de ces composés sont séparés sur papier imprégné de carbonate de sodium à l'aide d'une phase mobile constituée d'acétate d'éthyle et d'eau.

La séparation des azoïques dérivés de la p-nitraniline a été décrite par Rayburn, Haralan et Hanher (53) en 1953, pour l'analyse des phénols volatils contenus dans les fumées de cigarettes. La copulation a lieu en milieu alcalin. La chromatographie, réalisée par voie ascendante, est assurée à l'aide d'un solvant de migration constitué d'éther de pétrole et de méthanol aqueux à 50 p. 100 (1 : 1 : 0,4).

2) *Chromatographie des bromophénols.* — Grebenovsky (31) a séparé, en 1963, les bromophénols par chromatographie ascendante sur papier Whatmann n° 3 imprégné de paraffine liquide. La phase mobile est une solution à 60 p. 100 d'acide acétique dans l'eau. Les dérivés polybromés des phénols sont obtenus, dans un premier temps, par action d'une solution de bromure/bromate de sodium sur des solutions de phénols dans l'acide acétique glacial. Après destruction de l'excès de brome, par addition d'iodure de potassium et réduction de l'iode métalloïdique formé par une solution d'hyposulfite de sodium, les bromophénols sont extraits de la liqueur au moyen d'une solution à 10 p. 100 de paraffine liquide dans le benzène.

Après la séparation chromatographique, la révélation des bromophénols sur le document s'obtient par pulvérisation d'une solution de ferrocyanure ferrique. En découpant les fragments de papier sur lesquels se trouvent les spots, puis en les minéralisant par la microméthode de Schindger et en dosant le brome par potentiométrie, on peut connaître les quantités des bromophénols présents dans la prise d'essais.

2) *Chromatographie sur couches minces :*

a) - *Chromatographie des phénols libres :*

Wagner (75) décrit, en 1955, la séparation du phénol, des crésols, du gaïacol, de l'eugénol et du thymol sur couches minces constituées d'un mélange de gel de silice, de kieselguhr et d'amidon (1:1:1) avec des phases mobiles obtenues par des mélanges en diverses proportions ((75:25) (50:50) et (25:75) (v/v)) de chloroforme et de xylène. Hermanek, Schwartz et Cekan (32) ont séparé le phénol, l'o-crésol et le p-crésol ainsi que le thymol, l'α et le β-naphtol sur couches minces d'alumine activée par addition de 4 p. 100 d'acide acétique cristallisable. Les xylénols isomères ont été séparés par Petrowitz (51) en 1961 sur des supports composés de gel de silice et de plâtre de Paris. La phase mobile était composée de benzène et de méthanol (9:1). Pour résoudre un problème analogue, Lapina (43) a décrit une couche mince obtenue en

mélangeant du silicagel et de l'amidon. Le solvant est constitué alors soit de benzène pur, soit d'un système benzène : acide acétique : eau (2:2:1) (v/v).

Seeboth (63) chromatographie les phénols sur couches minces de silicagel A, de supergel et d'un mélange de ces deux substances avec de l'alumine acide. Divers solvants sont indiqués par cet auteur :

— chloroforme : acide acétique (5:1).

— chloroforme : acétone : acide acétique (10:2:1).

— benzène : acide acétique (5:1).

— éther de pétrole : tétrachlorure de carbone : acide acétique (4:6:1).

— chloroforme : acétone : diéthylamine (20:10:1).

Pastuska (50) opère la séparation des phénols sur silicagel G avec les systèmes

— benzène : dioxane : acide acétique (90:25:4).

— benzène : méthanol : acide acétique (45:8:3).

b) - *Chromatographie des hydroxyazoïques :*

Smith et Sullivan (68) décrivent la séparation des p.nitrobenzène-azo-phénols du phénol, des crésols et du α gaïacol. Les phénols sont copulés en milieu acide avec le diazoïque. Les azoïques sont extraits en milieu acide par l'éther. La liqueur est séchée sur sulfate de magnésium et une fraction aliquote de cette solution est déposée sur une couche mince de kieselgel G imprégnée de formamide. Les solvants de migration sont :

— benzène : cyclohexane : dipropylamine (30:70:3).

— benzène : cyclohexane : diéthylamine (3:5:1).

La séparation chromatographique des hydroxyazoïques dérivés d'une bentramine : le Fast Red A.L. (sel stable du diazoïque de l'α-amino anthraquinone) a été proposée par Knappe et Rhodewald (76). La copulation est obtenue en milieu alcalin et les diazoïques extraits en milieu acide par le chloroforme. La couche mince nécessaire à la séparation est constituée de Silicagel G traité au préalable par le carbonate de sodium. Le solvant de migration est composé de dichlorométhane, d'acétate d'éthyle et de diéthylamine (92:5:3). Dans ces conditions le phénol, l'o-crésol, les 2-3, 2-5 et 2-6 xylénols sont complètement séparés. Le 3-5-xylénol, le m-crésol et le 2-4-xylénol présentent le même Rf. Une bonne résolution du mélange des azoïques du phénol, du 3-5-xylénol et du m-crésol est obtenue en effectuant la chromatographie avec un mélange solvant constitué de : chloroforme, d'acétate d'éthyle et d'éthanol (93:5:2). Lorsque l'on utilise une plaque de silicagel G traité par l'acide oxalique et que le benzène est pris

comme phase mobile, on obtient une bonne séparation des azoïques du 3-4-xylénol, du p-crésol et du 2-4-xylénol.

Renault J. et Carton M.F. ont décrit récemment la séparation des p.nitrobenzène azoïques du phénol, des 3-crésols et des 6-xylénols par chromatographie sur Kieselgel G à l'aide du solvant : benzène : méthanol (180:20).

3) *Techniques de révélation des phénols après leur séparation chromatographique sur papier et sur couches minces.* — La méthode la plus simple pour repérer les phénols en chromatographie en couches minces consiste à utiliser un support additionné d'un composé fluorescent lorsqu'il est excité par un rayonnement ultraviolet de longueur d'onde convenable (silicate de zinc, silicate double de zinc et de cadmium).

Les phénols absorbent le rayonnement et annulent la fluorescence là où ils se trouvent. Aussi les spots apparaissent sous forme de taches sombres sur un fond luminescent jaune-vert. Cette méthode n'est pas spécifique, puisque tous les composés aromatiques conduisent au même phénomène.

La plupart des méthodes de caractérisation déjà décrites et qui développent une coloration ont été utilisées pour mettre en évidence les phénols sur les chromatogrammes sur papier et sur couches minces. Il est évident que le réactif mis en œuvre ne doit pas altérer le support, aussi les réactifs utilisés en chromatographie en couches minces sont-ils plus agressifs que ceux employés en chromatographie sur papier.

a) - *Formation d'azoïques :*

Les sels de diazonium de l'acide sulfanilique, de la 4-benzoylamino-2-5-diméthoxyaniline, de l'o-anisidine, et surtout de la benzidine et de la p-nitraniline, ont été mis en jeu Des sels de diazonium stables (fluoroborate de p.nitrobenzène diazonium, le bleu solide sel B (Merk, le bleu solide sel BB (Bayer)) sont également décrits comme réactifs (64, 69).

En général, on prépare extemporanément les solutions de sel de diazonium que l'on pulvérise sur le document. On vaporise ensuite une solution alcaline (carbonate de sodium, soude). Ces méthodes, très sensibles, permettent d'obtenir des taches de colorations différentes, selon le phénol détecté.

b) - *Réactif de Millon :*

Le réactif de Millon est obtenu en dissolvant du mercure dans de l'acide nitrique concentré. La liqueur est diluée de moitié avec de l'eau distillée et on pulvérise sur le document. On obtient, dans la plupart des cas, des colorations rouges avec les monophénols, oranges ou brunes avec les di- et les tri-phénols.

c) - *Condensation avec la 2-6-dichloroquinone-chlorimine :*

Ce réactif permet de mettre en évidence les phénols non substitués en para. On pulvérise, dans un premier temps, une solution à 0,1 p. 100 de 2-6-dichloroquinone-chlorimine dans l'éthanol, puis une solution de véronal (pH = 10). On obtient des spots de coloration bleue.

d) - *Réduction du réactif de Folin :*

De faibles quantités de phénols sont mises en évidence en traitant le chromatogramme avec un acide phosphomolybdique. Blass et Vicaigne (4) ont utilisé, dans ce but, le réactif de Folin et Ciocalteu.

e) - *Complexes colorés avec le perchlorure de fer :*

En général, on pulvérise, sur le document, une solution à 0,2 pour 100 de chlorure ferrique dans de l'eau acidifiée par l'acide chlorhydrique. La réaction n'est pas très sensible mais présente l'avantage de conduire à des complexes de couleurs différentes avec les divers phénols. C'est ainsi que le phénol donne des spots violets et les crésols bleu-violets.

Les phénols, qui réduisent le fer trivalent en fer ferreux, peuvent être révélés par une première pulvérisation d'une solution de chlorure ferrique suivie d'un traitement par une solution de ferrocyanure de potassium. On obtient des taches bleues intenses (Bleu de Prusse).

***

Des données rassemblées sur la chimie analytique des phénols simples on peut retenir essentiellement les points suivants :

— les phénols peuvent être dosés et identifiés au moyen d'une grande variété de méthodes, lorsqu'un seul composé phénolique est présent dans la préparation à étudier.

— la séparation des constituants d'un mélange est obtenue actuellement à l'aide des méthodes chromatographiques, bien que peu de techniques conduisent à la résolution des mélanges complexes comprenant des isomères ou des substances de structures voisines.

OBJET DU TRAVAIL

Des données bibliographiques rassemblées, il ressort que, parmi les nombreuses méthodes d'identification et de dosage des phénols simples, les procédés de chromatographie en phase gazeuse et en phase vapeur présentent des avantages certains (rapidité, spécificité) mais nécessitent des appareillages spécialisés et coûteux. Les installations ne sont rentables que dans les cas où de très nombreux dosages doivent être couramment effectués. En Chimie Analytique Pharmaceutique il paraît plus convenable de s'adresser à des techniques plus simples pour effectuer les contrôles des médicaments avant leur livraison au public.

Dans ce domaine, il est indispensable de faire appel à un procédé propre à la fois à l'identification, à la séparation et au dosage.

La chromatographie en couches minces paraît être la technique la plus indiquée pour une solution élégante de ce problème, en raison de sa simplicité, de sa rapidité et de la possibilité d'effectuer un travail en série. Comme nous avons pu le constater, l'identification des phénols simples est particulièrement aisée en chromatographie en couches minces. Par contre, les déterminations quantitatives ne peuvent être réalisées en toute rigueur. Les phénols présentent des tensions de vapeur élevées, aussi une partie notable des échantillons se trouve volatilisée au cours du séchage du chromatoplaque qui suit le développement de la séparation.

Il est donc logique de penser à faire appel à la séparation et au dosage des dérivés stables des phénols à la condition que l'obtention de ces composés soit quantitative à l'échelle micro-préparative. Le dosage des phénols par formation de leurs hydroxyazoïques dérivés de la p-nitraniline a fait l'objet de nombreuses recherches. Le diazoïque de l'amine est stable et sa vitesse de copulation avec les phénols est élevée. Si l'on note également que les azoïques formés sont intensément colorés, ce qui procure une grande sensibilité et une facilité dans la détection, l'utilisation de ce principe de détermination est particulièrement séduisant. Aussi l'objet de notre thèse consiste-t-il à effectuer une étude systématique de ces possibilités analytiques dans le domaine quantitatif.

Nous avons tout d'abord préparé les azoïques des cinq phénols que nous désirions étudier (phénol, gaïacol, thymol, m- et p-crésol). Nous avons étudié leur comportement en chromatographie en

couches minces et précisé les conditions pour lesquelles on pouvait proposer leur dosage spectrophotométriquement après leur élution des chromatoplaques.

Ceci nous a conduit, dans une deuxième étape, à étudier l'influence de divers facteurs (pH, température, durée de la copulation) sur la diazocopulation afin de fixer les conditions opératoires susceptibles d'assurer la formation quantitative des hydroxyazoïques à l'échelle micro-préparative.

Nous avons appliqué alors les données expérimentales recueillies à la mise au point d'une technique permettant de doser les phénols et nous avons testé les possibilités analytiques du procédé proposé.

Dans une dernière étape de notre travail, nous avons envisagé le dosage du phénol et du gaïacol lorsque ces deux phénols sont présents dans diverses formes pharmaceutiques.

C'est la description des techniques mises en œuvre et des résultats que nous avons obtenus qui feront l'objet des différents chapitres de notre thèse.

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE PREMIER

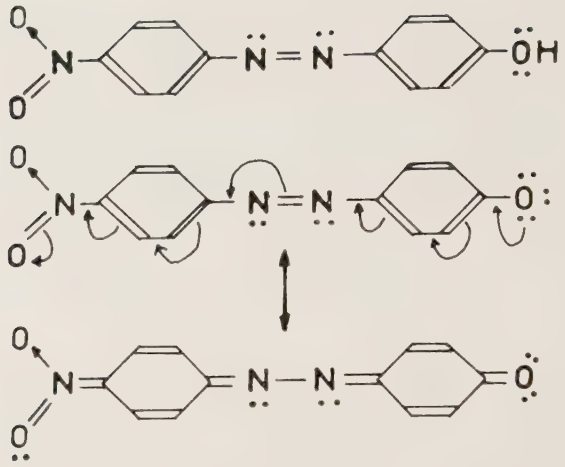
PREPARATION ET ETUDE ANALYTIQUE DES HYDROXYAZOIQUES DE QUELQUES PHENOLS SIMPLES ET DU P. NITROBENZENE DIAZONIUM

Les hydroxyazoïques sont préparés par action d'un sel de diazonium et d'un phénol. Le sel de diazonium lui-même se prépare au moment de l'emploi par action d'une amine aromatique primaire juxta-nucléaire sur l'acide nitreux naissant libéré au sein du milieu réactionnel par addition de nitrite de sodium à la solution acide de l'amine.

Nous avons choisi d'opérer avec le diazoïque dérivé de la p.nitraniline pour les raisons suivantes :

— La présence du groupement électronégatif nitré situé en *para* par rapport à la fonction amine permet une diazotation rapide, une grande stabilité de l'ion diazonium formé ainsi qu'une vitesse élevée de la réaction de copulation de celui-ci avec les phénols.

— La conjugaison des nombreuses doubles liaisons présentes dans l'hydroxyazoïque formé fait que celui-ci est intensément coloré. La coloration varie avec le phénol copulé mais aussi pour un même phénol avec la nature du solvant, son pH, en fait avec le degré d'ionisation de l'azoïque.



Dans la première étape de notre travail, nous avons préparé et isolé différents azoïques de phénols simples. Ces composés ont été étudiés en vue de déterminer leur comportement en chromatographie en couches minces et les conditions opératoires qui permettent de les éluer et de les doser par colorimétrie après leur séparation.

A) *Préparation et isolement des hydroxyazoïques.*

L'obtention des hydroxyazoïques comprend plusieurs temps qui consistent en la préparation du réactif diazoïque, en sa réaction avec la solution phénolique et enfin dans l'isolement de l'azoïque formé. Nous avons suivi la méthode préconisée par Perkin et Walles (49) en n'y apportant que quelques modifications de détails.

a) - *le réactif diazoïque :* Il est préparé de la manière suivante :

On dissout à chaud 0,5 g de p.nitraniline dans 100 ml de solution N d'acide chlorhydrique. On refroidit la solution au bain de glace. Lorsque la température de la préparation a atteint 0° on ajoute 10 ml d'une solution à 2,7 p. 100 de nitrite de sodium dans l'eau distillée, préparée extemporanément et également refroidie à 0°. On agite et on abandonne une demi-heure au bain de glace et à l'abri de la lumière.

Ce réactif contient 3,62 m Molécules de chlorhydrate de diazoïque.

b) - *diazocopulation :* On prépare une liqueur constituée de 50 ml de solution à 20 p. 100 d'acétate de sodium dans l'eau distillée et de 50 ml d'une solution de phénol que l'on désire copuler dans une solution 0,1 N de soude. Cette liqueur doit contenir un excès de phénol par rapport à la quantité correspondante au sel de diazonium contenu dans le réactif. Nous avons utilisé des solutions apportant dans 50 ml environ 4,9 mMolécules de phénol.

On mélange alors la totalité du réactif diazoïque à la solution phénolique. On attend 15 minutes à la température du laboratoire On ajuste le pH de la liqueur à la valeur de pH = 8 par addition d'une solution 2N de soude. Il se forme un précipité que l'on isole par filtration sur verre fritté en s'aidant de l'aspiration d'une trompe à eau. Le produit isolé est redissout dans de l'eau distillée. On acidifie par addition d'une solution 4N d'acide chlorhydrique.

On obtient à nouveau un abondant précipité floconneux que l'on isole et qu'on lave à l'eau distillée. On sèche dans un excicateur à vide sur chlorure de calcium (rendement de 40 à 90 p. 100 selon le phénol).

B) *Chromatographie en couches minces des hydroxyazoïques.*

Nous décrirons la technique générale de la chromatographie sur couches minces comprenant la préparation du support, les phases solvantes, le développement des chromatogrammes et les résultats obtenus.

1) *Préparation du support.* — Nous avons utilisé des plaques de verre de 8 cm sur 20 cm. La couche mince est constituée de Kieselgel G d'après Stahl (Merk). La poudre, rapidement agitée avec le double de son poids d'eau distillée, fournit une suspension homogène qui est étalée sur les plaques de verre. Nous avons disposé de l'applicateur DESAGA (Réf. 600). L'épaisseur du revêtement est de 0,3 mm.

La couche est abandonnée 10 minutes à l'air. On dispose les plaques sur un support spécial qui les maintient verticales. On les porte pendant une heure à l'étuve à 140°. Au bout de ce temps elles sont retirées de l'étuve et déposées dans une enceinte close, à l'abri des poussières, où elles se refroidissent.

2) *Solvants de migration.* — Nous avons utilisé les quatre solvants suivants :

-- benzène

-- benzène : méthanol (99:1) (v/v)

-- benzène : méthanol (98:2) (v/v)

-- benzène : méthanol (90:10) (v/v)

3) *Développement de la chromatographie.* — On dépose, à l'aide d'une micro-burette à piston (Prolabo) sur une ligne de départ située à 2 cm du bord inférieur de la plaque, de 10 à 50 µl de solution chloroformique d'azoïque apportant environ 20 µg de chacun des composés que l'on désire séparer. On évapore le solvant au fur et à mesure du dépôt au moyen d'un léger courant d'air.

La plaque est alors déposée verticalement dans une cuve de verre dont le fond est garni d'une couche de solvant de un cm d'épaisseur. On obture la cuve à l'aide d'une plaque de verre. On laisse le solvant migrer jusqu'à ce qu'il ait atteint une hauteur de 10 cm sur la plaque, ce qui nécessite, à la température du laboratoire, 30 minutes environ. On retire la plaque et on évapore le solvant de migration sous un léger courant d'air.

4) *Résultats.* — En raison de la coloration des azoïques, l'observation directe de la plaque permet de les repérer.

Les valeurs des Rf des azoïques étudiés dans les quatre solvants mis en œuvre sont rassemblées dans le tableau n° 4.

TABLEAU IV

Valeurs des Rf des hydroxyazoïques dérivés de la p-nitraniline et du phénol (P), du gaïacol (G), du thymol (T), du m-crésol (m-C) et du p-crésol (p-C) en chromatographie sur couches minces de Kieselgel pour différents solvants de migration

SOLVANT	P	G	T	m-C	p-C
Benzène	0,09	0,19	0,26	0,12	0,80
Benzène : méthanol (99:1)	0,19	0,32	0,48	0,33	1,00
Benzène : méthanol (98:2)	0,37	0,64	0,61	0,43	1,00
Benzène : méthanol (90:10)	0,61	0,84	0,81	0,79	1,00

De l'examen des résultats contenus dans le tableau n° 4 il ressort que les Rf des hydroxyazoïques croissent régulièrement en fonction de la teneur en méthanol du mélange solvant. L'identification de chacun des composés peut être assurée à l'aide du benzène comme phase mobile. Par contre, si l'on dispose d'un mélange complexe, il est intéressant d'utiliser un solvant tel que les Rf aient des valeurs voisines de 0,5. C'est ainsi que la résolution du mélange azoïque du phénol/azoïque du gaïacol est obtenue à l'aide du système benzène : méthanol (98:2) (v/v).

C) *Elution des azoïques après chromatographie sur couches minces.*

Le premier problème posé lors de l'élution des azoïques consiste dans le choix du solvant. Nous avons opéré au moyen de solution aqueuse d'isopropanol et de carbonate de sodium. Nous avons constaté qu'il était nécessaire de disposer de deux solvants.

Le solvant A, constitué de :

isopropanol ..... 10 ml

eau distillée ..... 40 ml

solution à 1 p. 100 de carbonate de sodium ..... 50 ml

est destiné à l'élution des azoïques du phénol et gaïacol.

Le solvant B, constitué de :

eau distillée ..... 10 ml

isopropanol ..... 40 ml

solution à 5 p. 100 de carbonate de sodium ..... 50 ml

est destiné à l'élution des azoïques du thymol, du m- et du p-crésol.

Après développement du chromatogramme et élimination du solvant par évaporation, on gratte soigneusement la partie de la couche mince portant l'azoïque à étudier. La poudre est recueillie sans perte dans un tube à centrifuger de forme conique et de 10 ml de capacité. On ajoute 3 ml de solvant. A l'aide d'un fin agitateur on met la poudre en suspension dans la liqueur. Celle-ci se colore. On centrifuge. On s'assure que le culot de centrifugation est parfaitement incolore. On récupère par aspiration la liqueur surnageante et on détermine la valeur de l'absorption de sa coloration.

Les azoïques des crésols et du thymol sont assez peu solubles. Il est intéressant de porter les tubes contenant la poudre et le solvant quelques minutes au bain-marie à 60°.

D) *Données spectrophotométriques des solutions d'hydroxyazoïques.*

Les cinq azoïques que nous avons préparés, à savoir les azoïques du phénol, du gaïacol, du m- et du p-crésol et du thymol, se sont montrés chromatographiquement purs. Nous les avons considérés comme des substances de référence.

Nous avons déterminé, à partir de solutions des azoïques dans leurs solvants convenables, leurs spectres d'absorption que nous présentons sous forme de graphiques dans la figure n° 1.

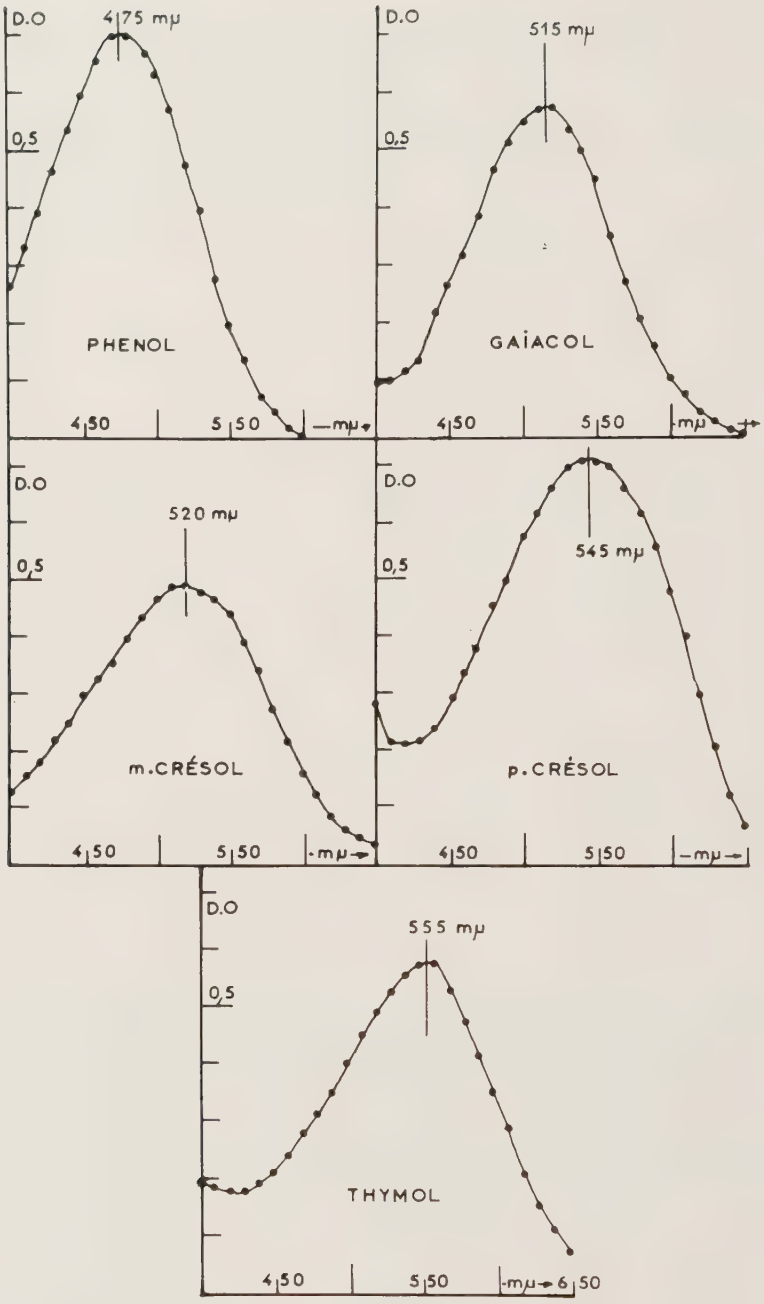


FIG. 1. — Spectres d'absorption de divers azoïques de la p-nitraniline et de phénols : phénol (solvant A), gaïacol (solvant A), m-crésol (solvant B), p-crésol (solvant B), thymol (solvant B).

Ces solutions contenant des quantités connues de composés nous ont permis d'établir certaines données spectrophotométriques :

— ξ_m : absorption moléculaire, soit l'absorption exprimée en D.O. sous une épaisseur de 10 mm d'une solution d'une molécule d'azoïque dans 1.000 ml de solvant.

— $E^{\%}_{1\ cm}$: absorption exprimée en D.O. sous une épaisseur de 100 mm d'une solution de 1 g d'azoïque dans 100 ml de solvant.

Nous avons rassemblé, dans le tableau n° 5, les valeurs des longueurs d'onde d'absorption maximum (λ_m), des ξ_m et des $E^{\%}_{1\ cm}$ des cinq azoïques étudiés.

TABLEAU V

Données spectrophotométriques des azoïques dérivés de la p.nitraline et de divers phénols

Hydroxyazoïques du	P.M.	λ_m (mμ)	ξ_m (D.O.)	$E^{\%}_{1\ cm}$ D.O.
phénol	248	475	32.500	1.360
gaïacol	273	515	30.200	1.170
thymol	299	555	45.000	1.500
m-crésol	257	520	36.200	1.450
p-crésol	257	545	28.200	708

Par ailleurs, nous avons soumis à la chromatographie des prises d'essai de quantités connues des différents azoïques. Après séparation et élution dans les conditions qui ont été décrites précédemment nous avons constaté :

— les spectres d'absorption des solutions d'élution sont identiques à ceux des solutions de substances étalons correspondantes et qu'ainsi la chromatographie n'altère pas les azoïques.

— de nombreuses expériences portant sur la chromatographie de quantités connues d'azoïques apportant de 5 μg à 25 μg de chacun des composés, suivie de l'élution des spots dans 3 ml de solvant, nous ont conduit à calculer à partir des données spectrophotométriques contenues dans le tableau V, que la récupération était quantitative. Ceci permet d'établir que l'on peut doser, après séparation chromatographique, les azoïques avec une précision inférieure à ± 2 p. 100.

CHAPITRE 2

ETUDE DE LA DIAZOCOPULATION DE QUELQUES PHENOLS SIMPLES AVEC LE P-NITROBENZENEDIAZONIUM

Nous avons montré précédemment que l'on pouvait doser les azoïques après leur séparation par chromatographie, suivie de l'élution des spots. Ceci nous a permis d'étudier divers facteurs (pH du milieu réactionnel, température et durée de contact entre les réactifs) sur la vitesse et le rendement en azoïque au cours de la diazocopulation. Nos résultats sont rassemblés dans le présent chapitre.

A) *Influence du pH.*

Comme nous l'avons vu, au cours de l'exposé bibliographique, le pH a une très grande importance dans l'évolution de la diazocopulation. Nous avons pu vérifier que celle-ci ne pouvait être effectuée en milieu acide minéral (pH égal ou inférieur à 2). En milieu alcalin, la diazocopulation des phénols présentant plusieurs carbones du cycle aromatique porteurs de charges négatives partielles (*ortho* et *para*), conduit à un mélange de composés mono- et poly-azoïques. Ceci se traduit lors de la chromatographie des composés provenant de la diazocopulation des phénols en présence de carbonate de sodium (pH = 10,0) par l'apparition de nombreux spots dont un seul de faible intensité correspond au mono-azoïque désiré.

De nombreux essais nous ont montré que les conditions les plus favorables à l'obtention du mono-azoïque étaient réalisées lorsqu'on opère à pH = 6, c'est-à-dire en milieu tamponné par une solution d'acétate de sodium.

B) *Influence de la température et de la durée de contact entre le sel de diazonium et le phénol.*

Nous avons adopté comme réactif diazoïque le réactif de Perkin et Wales (49) décrit p. 40. Au cours de cette série d'expériences nous avons suivi le protocole général suivant :

1) *Diazocopulation.* — On place dans un erlenmeyer de 100 ml de capacité 10 ml de solution à 20 p. 100 d'acétate de sodium, puis 1 ml d'une solution de 100 mg de phénol dissous dans 100 ml de

solution 0,1 N de soude. On porte le volume à 20 ml au moyen d'eau distillée. On ajoute alors 2 ml de réactif de diazotation. On abandonne à la température du laboratoire (20° - 22°).

Certaines diazotations ont été effectuées à 0°. Dans ce cas la solution phénolique tamponnée est refroidie au bain de glace et, après addition du réactif diazoïque, la préparation est conservée à 0° et à l'abri de la lumière.

2) *Extraction de l'azoïque.* — Au bout d'un temps déterminé, on ajoute à la préparation 4 ml de solution 4 N d'acide chlorhydrique. Ceci a pour effet d'arrêter la marche de la diazotation. On porte immédiatement la liqueur dans une ampoule à décantation de 50 ml de capacité avec les eaux de lavage de l'erlenmeyer (5 ml environ). On ajoute, au contenu de l'ampule, 5 ml exactement mesurés de chloroforme. On extrait le colorant par agitation pendant 5 minutes. On laisse reposer quelques minutes, puis on récupère la solution chloroformique en la filtrant sur un petit tampon de coton.

Nous avons vérifié que le rendement de l'extraction était, dans nos conditions opératoires, voisin de 99 % (+ 1).

—

3) *Chromatographie.* — Les chromatographies ont été effectuées sur des prises d'essais de 50 µl de solution chloroformique. Le solvant est choisi de telle sorte que le Rf de l'hydroxyazoïque étudié soit compris entre 0,40 et 0,70.

4) *Elution.* — Nous avons élué les spots selon les indications fournies précédemment (voir p. 42) à l'aide de 3 ml de solution isopropanolique convenable.

5) *Dosage spectrophotométrique.* — L'absorption de la coloration des solutions a été mesurée au spectrophotomètre pour la longueur d'onde optimum d'absorption de l'azoïque considéré et sous une épaisseur de 10 mm.

6) *Résultats.* — Les déterminations spectrophotométriques effectuées sur les liqueurs provenant de l'élution de la chromatographie de volumes connus de solutions chloroformiques nous permettent de connaître, en fonction des valeurs rassemblées dans le tableau V (p. 45), la quantité de colorant formée au cours de la diazocopulation d'un poids défini de phénol. Nous pouvons ainsi calculer le rendement de la copulation exprimé comme le pourcentage de la quantité d'azoïque obtenue par rapport à celle de la quantité que l'on doit obtenir si tout le phénol mis en jeu est transformé en colorant.

Nous avons rassemblé, dans le tableau VI, les rendements de la diazotation des phénols étudiés en fonction du temps de contact entre la solution phénolique et le réactif diazoïque. Ces essais ont été réalisés à la température de 20°. En ce qui concerne le phénol et le gaïacol nous avons également opéré la copulation à la température de 0°.

TABLEAU VI

Rendements de la diazotasion des phénols en fonction du temps de contact entre la solution phénolique et le réactif diazoïque

Phénol	Phénol		Gaïacol		m-Crésol	p-Crésol	Thymol
Température	0°	20°	0°	20°	20°	20°	20°
Durée de la diazo-copulation (en mn.)	%	%	%	%	%	%	%
5	53	100	77	84	73	56	66
10	52	100	76	76	78	74	63
15	53	100	—	72	—	—	63
20	—	100	62	—	80	86	58
30	—	90	60	47	77	86	56
40	—	—	—	—	—	86	—

De l'examen des résultats contenus dans le tableau VI il ressort que l'on peut assurer la diazotation complète du phénol en cinq minutes à la température du laboratoire. Il n'en est pas de même avec les autres substances étudiées. Le gaïacol, particulièrement réactif, conduit à des composés polysubstitués. A 20° il est impossible d'obtenir un rendement constant en mono-azoïque. Par contre, en opérant à 0°, pendant des temps de copulation compris entre 5 et 10 minutes on arrive à obtenir, d'une manière régulière, 77 p. 100 de mono-azoïque.

Le m-crésol et le thymol réagissent plus lentement que les deux phénols précédents. Une durée de copulation de 10 à 20 minutes permet de préparer 78 à 80 % de la quantité théorique d'azoïque. Le p-crésol réagit encore plus difficilement. La durée de contact de 30 mn entre le réactif et le phénol conduit à l'obtention de 86 p. 100 de colorant qui devrait être obtenu à partir de la quantité de crésol mise en œuvre.

CHAPITRE 3

TECHNIQUE DE DOSAGE DES PHENOLS

Les données rassemblées dans le deuxième chapitre de notre thèse nous montrent que l'on peut décrire une technique générale de dosage des phénols basée sur la transformation de ceux-ci en azoïques dérivés de la p-nitraniline. Cependant, pour chaque phénol, il est nécessaire de préciser certaines conditions opératoires à savoir : la durée et la température de la diazocopulation, le réactif permettant l'élution de l'azoïque après sa séparation par chromatographie sur couches minces et la longueur d'onde du maximum d'absorption de la coloration dans ce solvant.

Nous décrirons donc dans ce chapitre, tout d'abord la méthode générale, puis, pour les phénols étudiés, les conditions particulières de la mise en œuvre de la technique proposée.

A) *Méthode générale.*

1) *diazocopulation.* — On place dans un erlenmeyer de 100 ml de solution à 20 p. 100 d'acétate de sodium, la prise d'essai, soit un volume V ml de solution du phénol à doser dans la soude N/10 et un volume (V-1) ml de solution 0,1 N d'acide chlorhydrique. On porte le volume à 20 ml au moyen d'eau distillée. Cette liqueur est, soit maintenue à la température du laboratoire, soit pour le dosage du gaïacol refroidie à 0° au bain de glace.

On ajoute alors 2 ml de réactif diazoïque de Perkin et Wales (49) (voir p. 40). On homogénéise et on attend un temps qui dépend de la nature du phénol à doser. Au bout de ce temps on ajoute 5 ml de solution 4N d'acide chlorhydrique.

Extraction de l'azoïque. — La liqueur acidifiée est rapidement placée dans une ampoule à extraction de 50 ml de capacité avec les eaux de lavage de l'erlenmeyer. On ajoute 5 ml, exactement mesurés, de chloroforme. On extrait l'azoïque par agitation pendant 5 minutes. On laisse reposer. On soutire la phase chloroformique que l'on filtre sur un petit tampon de coton.

Chromatographie. — On dépose sur une plaque, recouverte d'une couche mince de kieselgel G (voir p. 41) une prise d'essai aliquote (en général 50 µl) de solution chloroformique. La chromatographie est développée à l'aide d'une phase mobile (voir p. 41), convenablement choisie, de telle sorte que l'azoïque que l'on

désire analyser ait un Rf compris entre 0,10 et 0,70 d'une part et que, d'autre part, il soit nettement différent de ceux des autres phénols qui peuvent se trouver dans la solution à étudier. La chromatographie porte donc sur un volume de solution chloroformique de l'ordre du 1/100e de celui du chloroforme ayant servi à l'extraction et contient une quantité d'azoïque correspondant de 2 à 10 µg de phénol (sauf en ce qui concerne le p.crésol pour lequel il est nécessaire de chromatographier une quantité d'azoïque correspondant de 5 à 20 µg de ce phénol).

Elution. — Après chromatographie, on chasse la phase mobile de la plaque par évaporation sous un courant d'air. On détache soigneusement, à l'aide d'un stylet, la partie du support imprégnée du composé à isoler. La poudre est recueillie sans perte dans un tube à centrifuger de forme conique et de 10 ml de capacité. On ajoute 3 ml de solution isopropanolique d'élution. On agite soigneusement en mettant en suspension la poudre dans la liqueur à l'aide d'un fin agitateur. On centrifuge et on récupère la liqueur colorée limpide.

Détermination spectrophotométrique et expression des résultats. — On détermine la valeur de l'intensité de l'absorption de la coloration sous une épaisseur de 10 mmm et pour la longueur d'onde optimum d'absorption de l'azoïque considéré.

On établit un diagramme de référence du dosage à l'aide des résultats obtenus dans les mêmes conditions par des déterminations effectuées sur des prises d'essai des solutions contenant des quantités connues du phénol à doser. On trace le diagramme en portant en ordonnées les densités optiques et en abscisses les quantités de phénol dont l'azoïque se trouve en solution dans la prise d'essai soumise à la chromatographie.

La valeur X trouvée, rapportée sur le diagramme d'étalonnage, permet de connaître la quantité du phénol contenue dans A µl de la solution chloroformique. Un calcul simple conduit à la valeur de la quantité de phénol contenue dans les 5 ml de solution chloroformique d'extraction, donc dans la prise d'essai de V ml soumis à la diazotation.

B) *Dosage du phénol.*

La diazocopulation du phénol est effectuée pendant 5 minutes à la température du laboratoire. Le solvant d'élution de l'azoïque est le solvant A. L'intensité de la coloration de la solution isopropanolique est déterminée pour une longueur d'onde de 475 mµ. La quantité de phénol mise en jeu pour effectuer le dosage dans les conditions standards (soit 50 µl de solution chloroformique soumise à la chromatographie) doit être comprise entre 0,200 et 0,800 mg.

Nous avons rassemblé sous forme de graphiques, dans la figure n° 2 divers résultats :

— *La courbe théorique* est obtenue en portant en abscisses

les valeurs de l'absorption (en D.O.) de solutions contenant dans 3 ml de solvant isopropanolique, les quantités d'azoïque correspondant à la diazotation complète des quantités de phénol portées en ordonnées. Cette courbe est établie à partir des substances de références que nous avons préparées.

— *Les points expérimentaux* sont établis à partir de déterminations portant sur l'application de la méthode générale aux dosages de quantités connues de phénol.

— *La courbe expérimentale* à 0° est tracée à partir des résultats obtenus par application de la technique en opérant la diazocopulation à 0°.

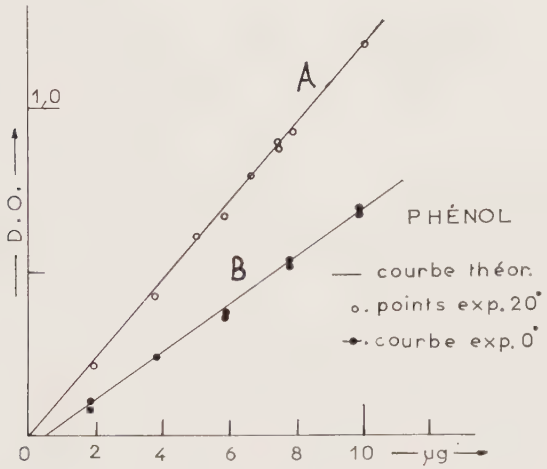


FIG. 2. — Courbes de référence pour le dosage du phénol. (Courbe A) - courbe théorique ; o : points expérimentaux obtenus par diazocopulation à 20°C. (courbe B) - courbe expérimentale correspondant à la diazotation du phénol à 0° ; . : points expérimentaux après diazotation à 0°.

L'examen des graphiques contenus dans la figure n° 2 montre :

— que la méthode décrite permet d'obtenir, en 5 minutes, à la température du laboratoire, la transformation totale du phénol mis en jeu en mono-azoïque correspondant. Les points expérimentaux se trouvent situés graphiquement sur la courbe théorique.

— la diazocopulation du phénol pendant 5 minutes à 0°C n'est pas complète : elle ne permet d'obtenir que 66 p. 100 de la quantité théorique d'azoïque. Bien que l'on puisse tracer, dans ces conditions une courbe de référence linéaire, ces conditions ne permettent d'effectuer le dosage du phénol qu'avec une sensibilité et une précision inférieures à celles que l'on obtient en opérant la copulation à la température du laboratoire.

Afin d'éprouver la reproductibilité de la méthode que nous proposons nous avons effectué des dosages sur des solutions de

titre connu apportant, dans la prise d'essai, 0,4 et 0,6 mg de phénol. D'une part nous avons réalisé trois diazocopulations pour chacune des doses étudiées et, d'autre part, nous avons chromatographié trois prélèvements de 50 µl de chacune des solutions chloroformiques obtenues. Les différents spots ont été élués et nous avons déterminé les intensités de l'absorption des solutions isopropanoliques correspondantes.

Les résultats de ces essais sont rassemblés dans le tableau VII.

TABLEAU VII

Vérification de la reproductibilité du dosage du phénol par la méthode proposée

Quantité de phénol dans la prise d'essai	Essai n°	D.O. des solutions isopropanoliques
0,400	1	0,41
		0,40
		0,41
	2	0,41
		0,38
		0,38
	3	0,38
		0,39
		0,39
0,600	1	0,60
		0,60
		0,60
	2	0,60
		0,60
		0,60
	3	0,59
		0,60
		0,61

Les résultats contenus dans le tableau VII montrent que la méthode que nous préconisons est parfaitement reproductible aux erreurs expérimentales près ($\pm$ 0,01 D.O.), soit $\pm$ 2 p. 100 pour une prise d'essai apportant 0,5 mg de phénol.

C) *Dosage du gaïacol.*

Nous avons fixé les conditions de diazocopulation à 5 minutes à la température de 0° C. Le solvant d'élution des spots est le solvant A (voir p.). L'intensité de la coloration de la solution isopropanolique est déterminée pour une longueur d'onde de 515 mμ. Ce mode opératoire a été choisi en fonction de la grande réactivité de ce phénol qui donne très facilement un composé polysubstitué. Le protocole adopté présente un moyen terme qui, en assurant un rendement élevé en l'obtention du mono-azoïque, évite la formation parasite des dérivés polysubstitués.
divers résultats :

— *la courbe théorique* obtenue comme dans le cas du phénol à partir de déterminations effectuées sur des solutions de titres connus en azoïque du gaïacol et rapportées aux quantités correspondantes de ce phénol.

— *la courbe expérimentale* tracée à partir des résultats obtenus par l'application de la technique proposée.

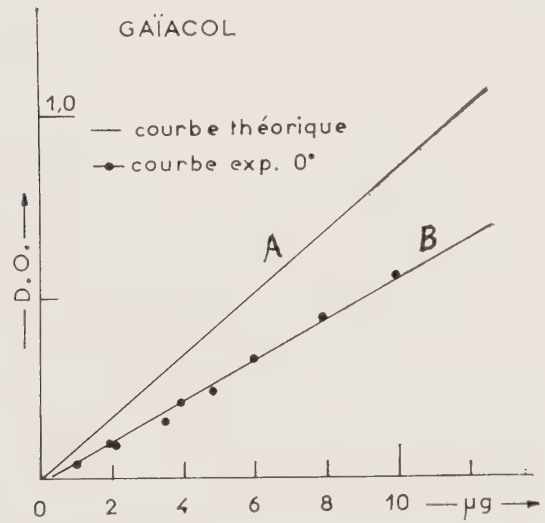


FIG. 3. — Courbes de référence pour le dosage du gaïacol (courbe A : courbe théorique, . courbe B : courbe expérimentale après diazotation à 0°).

L'examen des graphiques contenus dans la figure n° 3 montre que dans les conditions opératoires adoptées, la formation de l'azoïque du gaïacol n'est pas quantitative et ne correspond qu'à la formation de 76 p. 100 du colorant par rapport à la théorie.

De nombreuses déterminations nous ont montré que cette méthode donne des résultats parfaitement reproductibles et que l'on peut doser le gaïacol avec une précision de $\overset{+}{-}$ 5 p. 100.

D) *Dosages du m-crésol, du p-crésol et du thymol.*

Pour ces trois phénols, la diazotation a été réalisée à la température du laboratoire. La durée de la copulation a été fixée à 15 minutes en ce qui concerne le thymol et le m-crésol et à 30 minutes en ce qui concerne le p-crésol.

Nous avons rassemblé, dans la figure n° 4, des graphiques comportant les courbes théoriques et les courbes de référence expérimentales relatives à l'application de notre méthode aux dosages de ces trois phénols.

L'examen de ces graphiques montre que

— aucun des trois phénols n'est transformé en totalité en mono-azoïque. Les rendements sont respectivement de :

78 pour cent pour le m-crésol

87 pour cent pour le p-crésol

66 pour cent pour le thymol

— en raison de la faible valeur de l'ε_m de l'azoïque du p-crésol, la méthode n'est valable que pour des quantités de 0,4 à 2 mg de ce phénol dans la prise d'essai. Par contre, on peut doser le thymol et le m-crésol sur des prises d'essai contenant de 0,2 à 1,5 mg de ces substances.

De nombreux essais nous ont montré que l'on peut doser ces phénols sur des prises d'essai apportant 1 mg avec une précision de $\overset{+}{-}$ 5 pour 100.

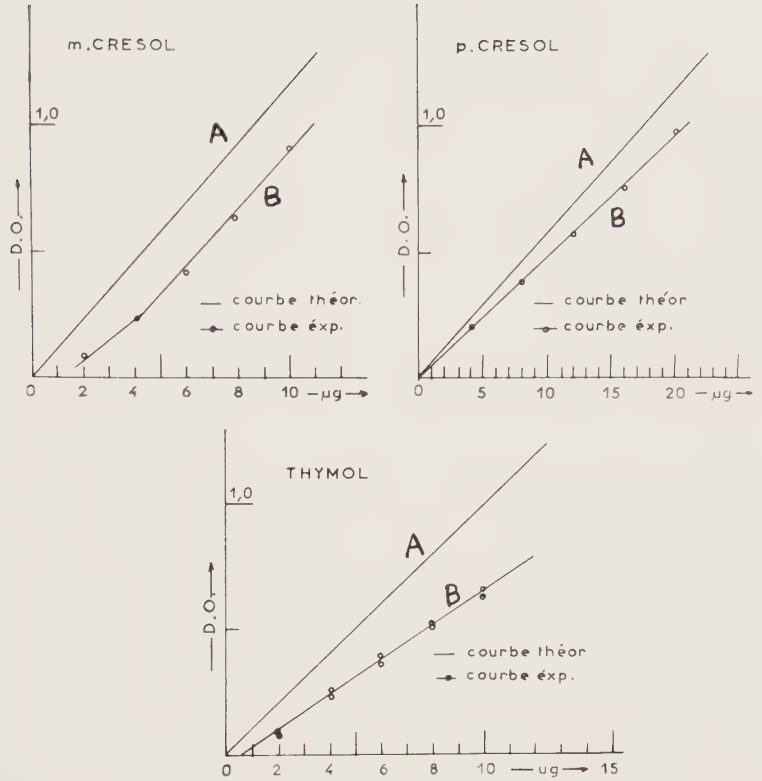


FIG. 4. — Courbes de référence pour ce dosage du m-crésol, du p-crésol et du thymol (A : courbes théoriques ; o B : courbes expérimentales) (m-crésol et thymol = diazotation 15 minutes à 20°C, p-crésol : diazotation 30 minutes à 20°C).

En résumé, les conditions particulières d'application de la méthode générale relative aux dosages des cinq phénols étudiés sont les suivantes :

	phénol	gaïacol	thymol	m-crésol	p-crésol
Diazotation					
temps (mn)	5	5	15	15	30
température (°C)	20	0	20	20	20
Solvant	A	A	B	B	B
λm (mµ)	475	515	555	520	545
quantité (mg)	0,2-0,8	0,2-1,5	0,2-1,25	0,2-1,3	0,4-2,0

CHAPITRE 4

DOSAGE DU PHENOL ET DU GAIACOL DANS DIVERSES PREPARATIONS PHARMACEUTIQUES

Le phénol et le gaïacol, comme tous les phénols, ont des propriétés antiseptiques générales. Le gaïacol, moins caustique que le phénol, présente à côté d'une activité anesthésique locale, des propriétés antiseptiques pulmonaires. Ils trouvent leur emploi en association en stomatologie, en otorhinolaryngologie et en thérapeutique pulmonaire banale.

Les méthodes générales d'analyse ne permettent pas, d'une manière simple, d'effectuer le dosage de ces phénols lorsqu'ils sont en mélange. Aussi, avons-nous pensé appliquer la méthode que nous avons mise au point au contrôle de préparations pharmaceutiques comprenant ces deux substances. Nous avons analysé cinq préparations utilisées en thérapeutique dentaire, et une forme suppositoire.

A) *Préparations pour stomatologie.*

Ces préparations se présentent sous forme de liquides dans lesquels le phénol et le gaïacol sont dissous dans un excipient glycérolé. Les compositions centésimales des cinq préparations étudiées sont les suivantes :

Dénomination	phénol (en g p. 100)	gaïacol (en g p. 100)	rapport P/G (p/p)
R-4	36,83	29,46	1,14
R-8	59,25	29,12	2,00
R-10	25,00	5,00	5,00
R-C	46,33	6,8	6,66
R-E	56,54	3,77	15,00

1) *Dosage du phénol.* — Le dosage du phénol a été réalisé sur 1 ml d'une dilution du produit commercial dans la soude 0,1 N

contenant environ 0,8 mg de phénol dans la prise d'essai. Les dilutions ont été réalisées à partir de pesées d'un échantillon de la préparation.

Le protocole général a été mis en œuvre et la séparation chromatographique des azoïques est réalisée en couches minces à l'aide du solvant benzène:méthanol (98:2) (v/v).

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII

Dosage du phénol dans cinq préparations pour stomatologie

Dénomination	Phénol (en g p. 100)			
	Essai n°	théorie	trouvé	écart (en p. 100)
R-4	1	35,83	38,1	+ 3,5
	2		38,2	+ 3,5
R-8	1	58,25	59,4	+ 2,0
	2		59,8	+ 3,0
R-10	1	25,0	25,5	+ 2,0
	2		24,5	— 2,0
R-C	1	46,33	43,5	+ 5,6
	2		46,2	+ 0,2
R-E	1	56,54	55,4	— 2,0
	2		59,0	+ 5,0

De l'examen des résultats contenus dans le tableau VIII, il ressort que le dosage du phénol dans les différentes préparations analysées permet de déterminer la teneur en phénol avec une précision inférieure ou égale à $\pm$ 5 p. 100.

2) *Dosage du gaïacol.* — Les déterminations du gaïacol doivent être effectuées sur des prises d'essais apportant un mg de ce phénol. Or il existe, dans les préparations étudiées, de très grandes différences dans les proportions relatives du phénol et du gaïacol.

C'est ainsi que l'on note que pour 1 mg de gaïacol (soit 8,06 µEq) on trouve :

dans R-4 12,7 µEq de phénol, soit 20,76 µEq de phénols totaux
dans R-8 20,4 µEq de phénol, soit 28,46 µEq de phénols totaux
dans R-10 51,0 µEq de phénol, soit 59,06 µEq de phénols totaux
dans R-C 68,0 µEq de phénol, soit 74,06 µEq de phénols totaux
dans R-E 153,0 µEq de phénol, soit 161,06 µEq de phénols totaux

Or 2 ml de réactif de Perkin et Wales n'apportent que 76 µEq de sel de diazonium. Il est donc nécessaire, dans chaque cas, de fixer les modalités telles que l'on puisse avoir, au cours de la diazotation, un excès de réactif copulant par rapport à la quantité totale de phénols mis en jeu. La diazocopulation devant être réalisée à pH = 6 on est amené à ajouter à la liqueur un volume de solution de soude tel qu'il conduise à la neutralisation d'une partie du réactif diazoïque. Enfin, la présence d'une quantité importante d'azoïques conduit à la nécessité de mettre en œuvre un volume de chloroforme suffisant pour assurer l'extraction quantitative.

Nous donnons, dans le tableau IX, les volumes des réactifs utilisés dans chaque cas pour le dosage du gaïacol dans les cinq produits analysés.

TABLEAU IX

Conditions expérimentales utilisées pour le dosage du gaïacol dans les cinq préparations pour stomatologie

Produit analysé	R-4	R-8	R-10	R-C	R-E
Poids de l'échantillon (en g) (dans 100 ml de soude 0,1 N)	0,34	0,34	2,00	1,47	2,65
Diazotation (Volume en ml)					
Solution à 20 p. 100 d'acétate de sodium..	10	10	10	10	10
NaOH N	—	—	—	1	3
Eau distillée	9	9	9	8	6
R. de diazotation	2	2	3	3	5
Extraction					
Chloroforme (ml) ...	5	5	5	5	10
Prise d'essai de la solution chloroformique (dépôt en µl)	50	50	50	50	70

Les diazocopulations sont réalisées pendant 5 minutes à 0°. La chromatographie en couches minces est effectuée avec la phase mobile : benzène : méthanol (98 : 2) (v/v).

Les résultats des dosages du gaïacol dans les cinq préparations sont rassemblées dans le tableau X.

TABLEAU X

Dosage du gaïacol dans cinq préparations pour stomatologie

Préparation	théorie	trouvé	écart
R-4	29,46	31,5	+ 2,04
R-8	29,12	30,0	+ 1,42
R-10	5,0	6,0	+ 1,0
R-C	6,8	6,2	— 0,6
R-E	3,77	2,5	— 1,27

L'examen des résultats contenus dans le tableau X montre que l'on peut doser le gaïacol en présence de phénol dans les préparations pharmaceutiques par la méthode proposée avec une bonne approximation. Les écarts enregistrés sont de l'ordre de grandeur de ceux rencontrés pour le dosage du gaïacol en solution pure lorsque le gaïacol se trouve en proportion notable et lorsqu'il n'y a pas une trop grande disproportion quantitative entre le gaïacol et le phénol (respectivement + 6 p. 100 et + 4,5 pour 100 pour les préparations R-4 et R-8).

Les erreurs deviennent plus importantes en valeur relative dans les autres cas. On note cependant, qu'en valeurs absolues, les écarts sont du même ordre de grandeur et ne sont pas systématiques.

On peut cependant conclure que la méthode proposée est satisfaisante pour le contrôle de ces préparations pharmaceutiques.

B) *Suppositoires.*

Nous avons analysé un lot de suppositoires de composition suivante :

phénol	0,012 g
gaïacol	0,060 g
autres constituants et excipients	
beurre de cacao	q. s.p. pour un suppositoire

L'extraction des phénols est réalisée en plaçant, dans un bécher de 50 ml de capacité un suppositoire et 25 ml de solution 0,1 N de soude. On met la masse, fondue au bain-marie à 60°, soigneusement en suspension dans la liqueur aqueuse. On laisse refroidir de manière à ce que l'excipient constitue un gâteau à la surface du liquide. On récupère la phase aqueuse. On renouvelle

cette opération deux fois. On rassemble les liquides alcalins dans un ballon jaugé de 100 ml et on porte au trait de jauge au moyen de la solution 0,1 N de soude.

Le dosage du phénol s'effectue dans les conditions suivantes. On place dans un erlenmeyer :

solution d'acétate de sodium à 20 p. 100	10 ml
solution N de soude	1,4 ml
solution alcaline d'extraction	5,0 ml
eau distillée	3,6 ml
réactif de diazotation	3,0 ml

Après cinq minutes de contact à la température du laboratoire on acidifie, au moyen de 5 ml de solution, 4N d'acide chlorhydrique. On extrait l'azoïque formé par 5 ml de chloroforme. On effectue la chromatographie sur une prise d'essai de 50 µl de la liqueur chloroformique.

Le dosage du gaïacol se réalise dans les conditions suivantes. On place dans un erlenmeyer :

solution d'acétate de sodium à 20 p. 100.....	10 ml
solution 0,1 N d'acide chlorhydrique	0,5 ml
solution alcaline d'extraction	1,5 ml
eau distillée	8,0 ml
réactif de diazotation	2,0 ml

Après cinq minutes de contact à 0°, la liqueur est acidifiée et les azoïques extraits et séparés comme précédemment.

Les résultats des dosages sont rassemblés dans le tableau XI.

TABLEAU XI

Dosage du phénol et du gaïacol dans un suppositoire

Essai n°	Phénol (en mg/suppos.)		gaïacol (en mg/suppos.)	
	Théorie	Trouvé	Théorie	Trouvé
	—	—	—	—
1	10,0	6,0	60,0	48,0
2	10,0	6,4	60,0	46,0
3	10,0	6,2	60,0	45,0
Moyenne des résultats expérimentaux	.....	6,2	.....	46,3

L'examen des résultats contenus dans le tableau XI montre un bon accord entre les déterminations effectuées sur trois échan-

tillons d'un même lot. Il montre un déficit notable des phénols par rapport à la théorie de 38 p. 100 pour le phénol et de 23 p. 100 pour le gaïacol.

La recherche des phénols dans les résidus d'extraction ayant été négative, les pertes observées ne sont pas dues à cette opération. Pour vérifier nos résultats, nous avons dosé les phénols totaux dans les liquides d'extraction des suppositoires par bromométrie, selon le protocole décrit à la PHARMACOPÉE FRANÇAISE, VIII[me] édition, 1965, p. 787. On sait que, dans ces conditions, un ml de solution 0,1 N d'hyposulfite de sodium utilisé dans le dosage correspond à 1,47 mg de phénol et à 3,1 mg de gaïacol Les dosages ont été réalisés sur des prises d'essais de 50 ml des solutions d'extraction et les résultats sont exprimés ici en ml de solution 0,1 N d'hyposulfite. Nous avons calculé les volumes théoriques que l'on doit trouver d'une part, en fonction de la quantite théorique de phénols et, d'autre part, à partir des résultats des dosages réalisés par notre méthode. L'ensemble des valeurs est rassemblé dans le tableau XII.

TABLEAU XII

Résultat des dosages bromométriques (en ml de solution 0,1 N d'hyposulfite de sodium) effectués sur les liqueurs d'extraction des suppositoires

	Phénol		Gaïacol		Phénols totaux V. d'hypo (ml)	
	(mg)	V. d'hypo (ml)	(mg)	V. d'hypo (ml)	Théorie	Trouvé
Formule théorique	10	6,8	60	19,8	26,6	
Essai n° 1	6	3,6	48	16,8	20,4	20,3
Essai n° 2	6,4	3,2	46	14,8	18,0	18,1
Essai n° 3	6,2	3,4	45	14,5	17,9	17,9

De l'examen des résultats rassemblés dans le tableau XII, il ressort que le dosage des phénols totaux réalisé par bromométrie est en excellent accord avec les déterminations effectuées par la méthode que nous préconisons. Ceci correspond à un déficit moyen en phénols de 28,4 p. 100 par rapport à la formule théorique. Nous pouvons conclure que notre méthode d'analyse est satisfaisante et que les pertes notées sont dues soit à un défaut dans la préparation du médicament, soit à une mauvaise conservation de celui-ci.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Arrivés au terme de nos recherches, il convient maintenant de résumer notre travail et d'en dégager les principales conclusions.

Nous avons tenu à rassembler une documentation bibliographique qui porte sur l'ensemble des méthodes proposées pour l'identification et le dosage des phénols simples. Les principes des méthodes analytiques reposent sur les propriétés chimiques générales des molécules phénoliques que nous avons brièvement rappelées. Nous avons pu classer les méthodes d'analyse selon les différents types de réactions mises en œuvre, à savoir : les réactions d'éthérification, d'estérification, de substitution électrophile, d'oxydation et de formation de composés d'addition. Aucune de ces méthodes n'est spécifique et ne permet de doser un phénol en présence d'autres composés phénoliques.

Ce manque de spécificité conduit nécessairement à effectuer la séparation des phénols préalablement à leur dosage. Les méthodes modernes de fractionnement sont les seules à conduire à des résultats valables. La séparation par distribution à contre-courant et les chromatographies en phase gazeuse et par entraînement par les vapeurs paraissent être les méthodes de choix pour l'analyse des mélanges complexes. Les méthodes classiques nécessitent en chromatographie en phase gazeuse des colonnes longues qui provoquent des pertes en charge importante. Aussi la séparation des mélanges d'isomères est-elle loin d'être parfaite Ces techniques demeurent applicables pour l'analyse de certains mélanges. Par contre, la chromatographie en colonnes capillaires des éthers triméthylsilyliques des phénols est actuellement la méthode de séparation et d'identification de loin la plus satisfaisante. Elle nécessite des manipulations délicates et un appareillage coûteux.

Pour les besoins courants, la chromatographie sur support (papier et couches minces) est la plus utilisée. Néanmoins, dans le domaine quantitatif, ces méthodes sont limitées. Aussi s'est-on adressé à la séparation des composés stables des phénols, faciles à préparer et autant que possible colorés. Dans ce domaine, la chromatographie des azoïques des phénols est particulièrement satisfaisante et a fait l'objet d'applications pour l'identification des phénols à l'état de traces.

C'est l'étude de la formation des mono-azoïques dérivés de la

p-nitraniline et des phénols simples (phénol, gaïacol, thymol et p-crésol) de leur séparation en chromatographie sur couches minces dans le but de mettre au point une méthode de dosage de ces phénols que nous avons poursuivie. Les résultats de notre travail sont les suivants :

1° Nous avons préparé les mono-azoïques des cinq phénols. Nous avons étudié leur comportement en chromatographie sur couches minces de Kieselgel et déterminé leur Rf lors de l'utilisation de plusieurs solvants de migration : solvant constitués de mélanges en diverses proportions de benzène et de méthanol. Nous avons précisé les conditions convenables pour éluer les azoïques du support après leur chromatographie. Nous proposons deux solvants constitués de solution aqueuse de carbonate de sodium et d'isopropanol. Nous avons établi certaines données spectrophotométriques des azoïques dans leur solvant convenable et nous avons vérifié que l'on pouvait aussi procéder aux dosages des azoïques des 5 phénols étudiés.

2° Ces données nous ont permis d'étudier quantitativement la diazocopulation des phénols avec le p-nitrobenzène diazonium. Nous avons montré que l'obtention du mono-azoïque est réalisée facilement en milieu acide faible (pH = 6). En milieu alcalin, les phénols simples conduisent à un mélange de dérivés mono- et polysubstitués. Les phénols, doués d'une grande réactivité tels que le gaïacol, conduisent à pH = 6 à des polyazoïques. Nous avons alors fixé les conditions opératoires (température, durée de la diazotation) compatibles avec un rendement élevé et constant en mono-azoïque.

Les phénols étudiés présentent des réactivités différentes et il a été nécessaire de fixer, pour chacun d'eux, les conditions de copulation les plus convenables. Le phénol peut être intégralement transformé en son mono-azoïque en cinq minutes à la température du laboratoire. Par contre, pendant le même temps, on obtient à 0° que 76 p. 100 du mono-azoïque du gaïacol. Une température plus élevée et une durée de diazocopulation plus longue conduisent à la formation d'une quantité prohibitive de composés polysubstitués. En ce qui concerne le thymol et le m-crésol les conditions opératoires ont été fixées à 15 minutes de réaction à la température du laboratoire. Le p-crésol, moins réactif, est diazoté avec un rendement de 80 p. 100 en 30 minutes à 20°.

3° Ces résultats montrent qu'il n'est pas possible de proposer un procédé standard applicable pour le dosage de tous les phénols. On ne peut décrire qu'un protocole général qui doit être adapté pour chaque cas particulier. Ce protocole comprend plusieurs étapes qui sont les suivantes :

a) - *diazocopulation* : elle est réalisée en milieu acide faible, tamponné par une solution d'acétate de sodium. La température et la durée de la copulation dépend du phénol que l'on désire doser.

b) - *extraction de l'azoïque :* l'arrêt de la copulation est obtenu en passant en milieu acide minéral. L'azoïque, peu soluble en solution aqueuse, est quantitativement extrait par un volume connu de chloroforme.

c) - *séparation par chromatographie sur couches minces :* la séparation des azoïques est réalisée sur couches minces de kieselgel G à l'aide d'un solvant constitué de benzène et de méthanol et choisi de manière à ce que l'azoïque que l'on désire isoler ait un Rf différent de celui des azoïques des autres phénols présents dans la préparation. Une fraction aliquote connue de la liqueur chloroformique d'extraction est soumise à la chromatographie.

d) - *isolement et extraction de l'azoïque :* l'azoïque coloré est repéré directement sur le chromatoplaque par son Rf. Il est élué à l'aide d'un solvant convenable constitué d'une solution aqueuse de carbonate de sodium et d'isopropanol.

e) - *dosage :* la détermination spectrophotométrique de l'intensité de la coloration de la liqueur d'élution permet de connaître la quantité d'azoïque isolé, donc la quantité de phénol présent dans la liqueur soumis à la diazotation en se référant à une courbe d'étalonnage. Le spectre d'absorption de la solution isopropanolique permet de confirmer l'identité de l'azoïque isolé.

Dans ces conditions générales, nous avons pu montrer que, lorsque l'on dispose d'une solution ne renfermant qu'un seul phénol, on peut doser celui-ci avec une bonne approximation. C'est ainsi que, pour des quantités de phénol comprises entre 0,2 et 0,8 mg sont dosées avec une précision de $\pm$ 3 p. 100. Le gaïacol, le thymol et le m-crésol peuvent être dosés avec une précision de $\pm$ 5 p. 100 lorsqu'on met en jeu des prises d'essai apportant de 0,4 à 1,25 mg de composé. En ce qui concerne le p-crésol, il est nécessaire d'opérer sur des quantités comprises entre 0,4 et 2,0 mg.

4° La méthode proposée présente une très grande souplesse d'application, ceci en raison d'une part, de la fidélité de la réaction de copulation et, d'autre part, du fait que l'on peut faire varier certains facteurs dans d'assez grandes limites. On peut choisir le volume de la prise d'essai apportant le phénol à doser, le volume de chloroforme servant à l'extraction de l'azoïque ainsi que le volume de la prise d'essai de la liqueur chloroformique à soumettre à la chromatographie. Le faible volume de solution nécessaire à cette opération permet de faire plusieurs séparations sur le même essai, ce qui conduit à plusieurs déterminations spectrophotométriques donc à une plus grande précision dans le dosage. La rapidité de l'ensemble de la méthode, qui nécessite environ deux heures, permet des dosages en série.

La grande souplesse d'utilisation a été mise à profit pour l'analyse de préparations pharmaceutiques. Nous avons étudié cinq préparations utilisées en stomatologie, et une forme suppositoire. Les premières contiennent de 1,1 à 15 fois plus de phénol que de gaïacol, le suppositoire renferme 6 fois plus de gaïacol que de phénol. Nous avons décrit à titre d'exemple, dans chaque cas, le protocole particulier adopté. Nous avons pu ainsi montrer la validité et l'intérêt de notre technique, puisqu'elle nous a permis un contrôle satisfaisant de ces préparations.

En résumé, nous avons étudié, dans notre thèse, la réaction de diazocopulation du p-nitrobenzène diazonium avec cinq phénols simples dont trois d'intérêt pharmaceutique : le phénol, le gaïacol, le thymol, le m- et le p-crésol. Cette étude nous a permis de proposer un protocole général qui permet d'effectuer le dosage de ces phénols et qui comprend cinq étapes : diazotation, isolement des azoïques formés, séparation chromatographique des colorants, élution des azoïques que l'on désire doser et détermination spectrophotométrique de la liqueur d'élution. Nous avons montré que, pour chaque phénol, les conditions opératoires sont différentes en ce qui concerne la température et la durée de la diazotation et ce pour obtenir un rendement constant en mono-azoïque.

Ces conditions permettent de doser les phénols et de les caractériser sous forme de leurs azoïques. Nous avons donné, à titre d'exemple, les protocoles qui nous ont permis de contrôler, d'une manière satisfaisante, six préparations pharmaceutiques contenant en diverses proportions le phénol et le gaïacol.

Le Président du Jury
LU et APPROUVE
C. DUMAZERT

Pour le Doyen,
L'Assesseur
C. GREBUS

VU et PERMIS D'IMPRIMER
MARSEILLE, le 23 janvier 1968

BIBLIOGRAPHIE

1. *BARAC (G.).* — *C.R. Soc. Biol.*, 1934, *117*, 259.
2. BARIL (O.L.) et HAUBER (E.S.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1931, *53*, 1087.
3. BERGMANN (G.) et JENITZSCH (D.). — *Z. Anal. Chem.*, 1958, *164*, 11.
4. BLASS (J.) et VICAIGNE (M.B.). — *J. Chromatography*, 1963, *11*, 278.
5. BOST (R.W.) et NICHOLSON (F.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1935, *57*, 2368.
6. BRAMBERGER. — *Ber.*, 1900, *33*, 3188.
7. BROCKMANN (H.) et VOLPERS (F.). — *Chem. Ber.*, 1947, *80*, 77.
8. CARRUTHERS (W.), JOHNSTONE (R.A.) et PLIMMER (J.R.). — *Chem. and Ind.*, 1958, 331.
9. CASAL (P.). — *Thèse Pharmacie* (Université), Marseille, 1962.
10. CHATTAWAY (F.D.) et HILL (R.R.). — *Chem. Soc.*, 1922, *121*, 2756.
11. CHATTAWAY (F.D.). — *J. Chem. Soc.*, 1931, 2495.
12. CLARK (I.T.). — *J. Chromatography*, 1964, *15*, 65.
13. CONANT ( ) et PETERSON ( ). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1930, *52*, 1220.
14. CRAIG (L.C.) et CRAIG (D.). - in WEISSBERGER (A.). — Ed - *Techniques of organic Chemistry*, vol. III, part. 1, Interscience N.Y. 1956.
15. CRISTAU (B.). — *Thèse Pharmacie* (Etat), Marseille, 1954.
16. DEICHMANN (W.) et SCOTT (E.W.). — *Ind. Eng. Chem. Anal.*, 1939, *2*, 423.
17. DUMAZERT (C.) et GHIGLIONE (C.). — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1959, 615.
18. DUMAZERT (C.) et GHIGLIONE (C.). — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1960, 1770.
19. EVANS (H.M), EMERSON (O.H.) et EMERSON (G.A.). — *J. Biol. Chem.*, 1936, *113*, 319.
20. FOLIN (O.) et CIOCALTEU (V.). — *J. Biol. Chem.*, 1927, *73*, 627.
21. FRANC (J.) et JOKL (J.). — *C. Czechoslov. Chem. Commun.*, 1956, *21*, 1170.
22. FREEDMAN (R.W.) et CHARLIER (G.O.). — *Anal. Chem.*, 1964, *36*, 1880.
23. FREEDMAN (R.W.) et CROITOU (P.P.). — *Anal. Chem.*, 1964, *36*, 1389.
24. GHIGLIONE (C.). — *These Sciences* (Etat), Marseille, 1961.
25. GHIGLIONE (C.) et BOZZI-TICHADOU (M.). — *Bull. Soc. Pharm. Marseille*, 1956, *5*, 215.
26. GIBBS (H.D.). — *Chem. Rev.*, 1926, *30*, 291.
27. GIBBS (H.D.). — *J. Biol. Chem*, 1927, *72*, 649.
28. GOLUMBIC (C.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, *71*, 2627.
29. GORE (P.H.) et NEWMAN (P.J.). — *Anal. Chem. Acta*, 1964, *31*, 111.
30. GRANDMOUGIN (E.) et FREIMANN (H.). — *Ber.*, 1907, *40*, 2662.
31. GREBENOVSKY (E.) — *C. Zech. Chem. Commun.*, 1963, *28*, 2813.
32. HERMANEK (S.), SCHWARZ (V.) et CEKAN (Z.). — *Pharmazie*, 1961, *16*, 566.
33. HOUGHTON (G.U.) et PELLY (R.G.). — *Analyst.*, 1937, *62*, 117.
34. HOSFELD (R.L.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, *73*, 852.
35. HUDECEK (S.). — *Chem. Listy*, 1955, *49*, 60.
36. IRVINE (L.) et MITCHELL (T.J.). — *J. Appl. Chem.*, 1958, *8*, 3 et 425.
37. JANAK (J.) et KOMERS (R.). — *Z. Anal. Chem.*, 1958, *164*, 69.
38. KARR (C.C.), BROWN (P.M.), ESTEP (P.A.) et HYPHREY (G.L.). — *Anal. Chem.*, 1958, *30*, 1413.
39. KARR (C.C.), ESTEP (P.A.) et HIRST (L.L.). — *Anal. Chem.*, 1960, *32*, 463.
40. KNAPPE (E.) et ROHDEWALD (I.). — *Z. Anal. Chem.*, 1964, *200*, 9.

41 KREYENBUHL (A.) et WEISS (H.). — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1959, 1880.
42 LANGERS (S.H.), PANTAGES (P.) et WENDER (I.). — *Chem. and Ind.*, 1958, 1664.
43 LAPINA (T.G.). — *Trudy Khim. i Khim tekhnol.*, 1962, *2*, 424.
44. LEDERER (E.) et POLONSKY (J.).— *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1942. *24*, 1386.
45 LUGG (G.A.). — *Anal. Chem.*, 1963. *34*, 899.
46. LYMAN (J.A.) et REID (E.E.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1920, *42*, 615.
47 MILLON (E.). — C.R. 1849, *28*, 40.
48 MOIR (J.). — *J. South African Chem. Inst.*, 1922, *5*, 8.
49. PERKIN (S.) et WALES (H.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1924, *46*, 1488.
50. PASTURKA (G.). — *Z. Analyt. Chem.*, 1961, *179*, 355.
51.1 PETROWITZ (H.J.). — *Erdol, Khole*, 1961. 14 (*11*), 923.
52. PHILLIPS (M.) et KEEMAN (G.L.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1931, *53*, 1924.
53. RAYBURN (C.H.), HARLAN (W.R.) et HAMMER (H.R.). — *Anal. Chem.*, 1953, *25*, 1419.
54. RAYMOND-HAMET. — *Bull. Soc. Pharm.*, 1934, *41*, 224, 481.
55. REID (E.E.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1917, *39*, 304.
56. REIO (L.). — Chromatographic Review Vol. I, p. 39, LEDERER (M.), Ed. Elsevier Publishing Compagny, Amsterdam N.Y., 1961.
57. REIO (L.). — Chromatographic Review. Vol. 3, p. 92, LEDERER (M.). Ed. Elsevier Publishing Compagny, Amsterdam N.Y., 1961.
58. SAH (P.P.T.) et CHENG (P.Y.). — *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1939, *58*, 591.
59. SANCHEZ (J.A.). — *J. Pharm. Chim.*, 1935, *21*, 366.
60. SCHLEEDE (D.). — *Breennstoff. Chem.*, 1955, *36*, 78.
61 SCHMIDT (E.G.) et SCHMULOVITZ (M.I.). — *J. Biol. Chem.*, 1937, *120*, 705.
62. SCHNEIDER (K.W.) et OBERKOBUSCH (R.). — *Brennstoff. Chem.*, 1951, *32*, 110.
63 SEEBOTH (H.). — *Monatsber. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin*, 1963, *5*, 693.
64 SEEBOTH (H.) et GORSCH (H.). — *Chem. Tech. Leipzig*, 1963, *15*, 294.
65. SEKERA (V.C.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1933, *55*, 421.
66. SMITH (G.A.L.) et KING (D.A.). — *Chem. and Ind.*, 1964, *13*, 540.
67. SMITH (G.A.L.) et KING (D.A.). — *Analyst.*, 1964. *89*, 305.
68 SMITH (G.A.L.) et SULLIVAN (P.J.). — *Analyst.*, 1964. *89*, 312.
69. STAHL (E.) et SCHORN (P.J.). — Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1961, *325*, 263.
70 SOLTENBERG (H.). — *Z. Anal. Chem.*, 1955, *146*, 181.
71. SUBDOROUGH (J.J.) et BEARD (S.H.). — *J Chem. Soc.*, 1911, *99*, 209.
72. SWEENEY (T.R.) et BULTMAN (J.D.). — *Anal. Chem.*, 1953, *25*, 1358.
73 THEISS (R.C.) et BENEDICT (S.R.). — *J. Biol. Chem.*, 1924, *61*, 67.
74. VALENTIN (J.) et LUTHARD (K.). — *Pharmazie*, 1955, *10*, 600.
75. WAGNER (G.). — *Pharmazie*, 1955, *10*, 302.
76 WARD (H.P.) et JENKINS (E.F.). — *J. Org. Chem.*, 1945, *10*, 371.
77 WHITE (D.) et GRANT (D.G.). — *Nature*, 1955, *175*, 513.
78. ZAHNER (R.J.) et SWANN (W.B.). — *Anal. Chem.*, 1951, *23*, 1093.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

AVANT-PROPOS 17

INTRODUCTION 19

I. — PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DES PHENOLS 19

II. — METHODES GENERALES D'ANALYSES DES PHENOLS 21

A) *Ethérification* 21

B) *Estérification* 22

C) *Réactions de substitution électrophile des hydrogènes nucléaires* 23

D) *Oxydation des Phénols* 28

E) *Formation de composés d'addition* 30

III. — SEPARATION DES PHENOLS ET DE LEURS DERIVES 30

A) *Séparation par distribution à contre-courant* 31

B) *Chromatographie en colonne* 31

C) *Chromatographie sur support* 32

OBJET DU TRAVAIL 37

RECHERCHES PERSONNELLES 39

Chapitre Premier. — Préparation et étude analytique des hydroxy-azoïques de quelques phénols simples dérivés du p-Nitrobenzenediazonium 39

A) *Préparation et isolement des hydroxyazoïques* 40

B) *Chromatographie en couches minces des hydroxyazoïques* 41

Pages

C) *Elution des azoïques après chromatographie sur couches minces* 42

D) *Données spectrophotométriques des solutions d'azoïques* 43

Chapitre Deuxième. — Etude de la Diazocopulation de quelques phénols simples avec le p-Nitrobenzenediazonium 47

A) *Influence du pH* 47

B) *Influence de la température et de la durée de contact entre le sel de diazonium et le phénol* 47

Chapitre Troisième. — Technique de dosage des phénols.... 51

A) *Méthode générale* 51

B) *Dosage du phénol* 52

C) *Dosage du gaïacol* 55

D) *Dosage du m-cresol, du p-cresol et du thymol* 56

Chapitre Quatrième. — Dosage du phénol et du gaïacol dans diverses préparations pharmaceutiques 59

A) *Préparations pour la stomatologie* 59

B) *Suppositoires* 62

RESUME ET CONCLUSIONS 65

BIBLIOGRAPHIE 69